

Untersuchung der Interferonsensitivität des Hepatitis-D-Virus in vitro

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Paulina Perez Gonzalez

aus

Münster

2024

Betreuerin / Gutachterin der Dissertation: Prof. Dr. Maura Dandri-Petersen

Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Johannes K.-M. Knobloch

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Johannes K.-M. Knobloch

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Eva Tolosa

Mitglied der Prüfungskommission: PD Dr. Johann von Felden

Datum der mündlichen Prüfung: 18.11.2025

Inhaltsverzeichnis

1.	Arbeitshypothese und Fragestellung.....	6
2.	Einleitung.....	9
2.1	Das Hepatitis-D-Virus.....	9
2.1.1	Struktur und Replikation.....	9
2.1.2	Lebenszyklus	11
2.1.3	Epidemiologie.....	13
2.1.4	Genotypen.....	14
2.2	Das Hepatitis-B-Virus.....	16
2.3	HDV-Infektion.....	19
2.3.1	Klinik.....	19
2.3.2	Risikofaktoren und Transmission	21
2.3.3	Screening	21
2.3.4	Diagnostik	22
2.3.5	Prävention	24
2.3.6	Therapie	24
2.4	Immunreaktion bei HDV-Infektion	29
2.4.1	Erkennen von HDV-RNA und Auslösung einer Interferon-Sekretion	30
2.4.2	Intrinsische ISG-Induktion und adaptive Immunantwort.....	31
2.4.3	Mechanismen zur Umgehung des Immunsystems und viraler Persistenz.....	33
2.5	HDV-Tiermodelle.....	35
2.5.1	uPA/SCID/beige/IL2RG ^{-/-} (USG)-Mausmodell	36
2.6	HDV-Zellkulturmodelle	38
2.6.1	Tumorzelllinien	38
2.6.2	Primäre humane Hepatozyten (PHH)	39
3.	Material und Methoden.....	41
3.1	Material	41
3.1.1	Tabelle 1: Geräte	41
3.1.2	Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	42
3.1.3	Tabelle 3: Biomaterial	42
3.1.4	Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien	43
3.1.5	Tabelle 5: Pufferlösungen	44
3.1.6	Tabelle 6: Kits	44
3.1.7	Tabelle 7: Antikörper zur Immunfluoreszenzfärbung	45
3.1.8	Tabellen 8 und 9: Primer und Sonden	45
3.2	Methoden	47
3.2.1	Generierung und Infektion humanisierter USG-Mäuse	47
3.2.2	Zellisolation aus stabil infizierten humanisierten Mäusen	47
3.2.3	Zellkultur.....	48

3.2.3.1	PHHs aus humanisierten Mäusen.....	49
3.2.3.2	Kryokonservierte PHHs.....	50
3.2.4	Immunfluoreszenzfärbung.....	51
3.2.4.1	Immunfluoreszenzfärbung von Kammerobjektträgern	51
3.2.4.2	Immunfluoreszenzfärbung der Leber	51
3.2.5	Intra- und extrazelluläre DNA- und RNA-Isolation	52
3.2.6	Messung humaner und muriner Marker	53
3.2.7	Messung viraler Parameter	53
3.2.7.1	HDV-RNA.....	53
3.2.7.2	HBV-Parameter.....	54
3.2.8	Messung der Genexpression	55
3.2.9	Graphische Darstellungen.....	55
4.	Ergebnisse.....	56
4.1	In vitro Interferonbehandlung von stabil HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs	56
4.1.1	IFN α führt zu einer Reduktion der intra- und extrazellulären HDV-RNA und zu einer Abnahme der HDAg-positiven Hepatozyten.....	57
4.1.2	IFN α führt zu einer Reduktion von HBV-RNA und HBsAg, nicht jedoch der HBV-DNA	59
4.1.3	Verstärkung der intrinsischen ISG-Expression durch IFN α	62
4.1.4	Konstante Gesamtzellzahl und NTCP-Expression mit und ohne IFN α -Behandlung	65
4.2	In vitro Interferonbehandlung von in vivo HBV-infizierten PHHs nach HDV-1p-Superinfektion in vitro.....	67
4.2.1	Infizierte PHHs können über mindestens 25 Tage ohne Zellverlust durch IFN α -Behandlung in Kultur gehalten werden	68
4.2.2	HDV-Spreading in vitro dauert mindestens 24 Tage an und wird durch IFN α gebremst	69
4.2.3	Reduktion aller intra- und extrazellulären HBV-Parameter durch IFN α	71
4.2.4	Späte intrinsische HDV-induzierte ISG-Expression wird durch IFN α verstärkt	74
4.2.5	Erhalt der NTCP-Expression unter IFN α -Behandlung	76
4.3	Etablierung einer HDV-Monoinfektion in vitro in kryokonservierten PHHs und Vergleich des Ansprechens auf IFN α von HDV-1p und HDV-1cc	77
4.3.1	Leichte Reduktion der HDV-RNA durch IFN α bei HDV-1p ohne Ansprechen von HDV-1cc.....	77
4.3.2	Höhere ISG-Induktion in HDV-1cc-infizierten Zellen trotz fehlender Virussuppression durch IFN α	78
4.3.3	Kein Zellverlust durch IFN α	79
4.3.4	Abfall der NTCP-Expression bei HDV-Monoinfektion ohne Interferon-Therapie	81
5.	Diskussion	83
5.1	Etablierung eines HDV-Modelles als Schnittstelle zwischen in vivo- und in vitro-Experimenten	84

5.2	Charakterisierung eines neuen HDV-Virusstammes: Ansprechen von HDV-1p auf IFN α in vitro und Vergleich mit HDV-1cc.....	88
5.2.1	Einfluss von IFN α -Behandlung in vitro auf HDV-1p-Viruslast	89
5.2.2	IFN α -induzierter Zelltod unwahrscheinlich als Ursache für Virusreduktion bei HDV-1p-Infektion.....	91
5.2.3	HDV-1p vermittelte Immunreaktion wird durch IFN α verstärkt.....	92
5.2.4	Zusammenfassender Vergleich von HDV-1p und HDV-1cc	94
5.3	Einfluss von IFN α auf die NTCP-Expression	96
5.4	Zusammenfassung der Wirkungsweise von IFN α bei HDV-Infektion	98
5.5	Relevanz der Arbeit und Ausblick	102
6.	Zusammenfassung	104
7.	Literaturverzeichnis	106
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	131
9.	Abbildungsverzeichnis.....	133
10.	Tabellenverzeichnis	134
11.	Vorveröffentlichungen.....	135
12.	Erklärung des Eigenanteils	135
13.	Eidesstattliche Versicherung.....	136
14.	Danksagung.....	137

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Pegyliertes Interferon alpha (peg-IFN α) führt nur bei etwa 29 % der behandelten Hepatitis-D-Virus (HDV)-infizierten Patient:innen zu einem zufriedenstellenden Ansprechen mit anhaltender Repression der HDV-RNA (Abdrakhman et al. 2021). Als lange Zeit einzig verfügbares Medikament hat es dennoch einen hohen Stellenwert in der HDV-Therapie eingenommen. Die Zulassung des Hepatitis-B-Virus (HBV)/HDV-Entry-Inhibitors Bulevirtid 2020 hat zwar neue Möglichkeiten in der HDV-Behandlung aufgezeigt, führt in der Monotherapie jedoch ebenfalls nur bei etwas weniger als der Hälfte aller Patient:innen zu einer deutlichen Reduktion der HDV-Parameter (Wedemeyer et al. 2023) und zeigt in unterschiedlichen klinischen Studien in Kombination mit peg-IFN α eine höhere Resonanz als in der alleinigen Verabreichung. Außerdem konnte für Bulevirtid allein im Vergleich zu peg-IFN α bislang kein Effekt auf die Suppression des Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) nachgewiesen werden, was wiederum mit der langfristigen Reduktion der HDV-RNA korreliert (Lampertico et al. 2022, Wedemeyer et al. 2020). Beiden Medikamenten wird ein synergistischer Effekt zugesprochen, weshalb in den entsprechenden Leitlinien bei geeigneten Patient:innen auch die Erwägung einer Kombinationstherapie beider Präparate empfohlen wird (Brunetto et al. 2023, Cornberg et al. 2021, Sandmann et al. 2023).

Die Frage, warum peg-IFN α nur so geringe Heilungsraten für die HDV-Infektion erzeugt, hat in den letzten Jahren viele Arbeitsgruppen beschäftigt und bleibt weiterhin unklar. Interferon alpha (IFN α) trägt als immunmodulierende Substanz unter anderem über eine Stimulation von Interferon-stimulierten Genen (ISG) und Beeinflussung von beispielsweise natürlichen Killerzellen zur HDV-Abwehr bei (Sandmann und Wedemeyer 2023).

Nichtsdestotrotz wurde in verschiedenen Studien eine HDV-Resistenz gegenüber IFN α in humanisierten Mäusen (Chida et al. 2023, Ye et al. 2019) sowie stabil infizierten primären humanen Hepatozyten (PHH) und Tumorzellen (Chang et al. 2006, Han et al. 2011, Ilan et al. 1992, Lempp et al. 2019, McNair et al. 1994, Zhang et al. 2018) aufgezeigt und ein Effekt auf die vorhandene HDV-RNA-Menge in vitro trat lediglich bei IFN-Behandlung vor oder kurz nach dem Infektionszeitpunkt auf (Han et al. 2011). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass IFN α im HDV-Lebenszyklus lediglich im frühen Stadium auf Ebene des Zelleintritts in den Hepatozyten wirkt (Han et al. 2011) und IFN α daher die Ausbreitung von HDV verhindert (Zhang et al. 2018).

Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass all diese Versuche mit einem bestimmten Zellkultur-generierten Virusstamm (Zugriffsnummer GenBank: AJ000558, im Folgenden HDV-1cc genannt) durchgeführt wurden. HDV-1cc wurde bereits 1988 aus der Leber eines HDV-infizierten Walddarmeltieres isoliert, sequenziert und kloniert und stammt ursprünglich aus humanem HDV-infiziertem Serum. Vor Infektion des Walddarmeltieres wurde es dazu noch

einer mehrfachen seriellen Übertragung in Schimpansen unterzogen (Kuo et al. 1988). Zhang et. al bestätigten die Interferon-Resistenz bei HDV-1cc kürzlich erneut in Huh7-NTCP-Zellen und stellten eine IFN α -Wirkung auf HDV-1cc sowie einen patientengenerierten HDV-1-Stamm aus Äthiopien und HDV-3 ausschließlich im Rahmen der Zellteilung fest. Sie gehen daher ebenfalls lediglich von einem exogenen Interferon-Effekt auf die Zellteilungs-vermittelte HDV-Ausbreitung aus (Zhang et al. 2022).

Im Gegensatz dazu konnte für einen neuen HDV-Virusstamm vom Genotyp 1, welcher aus dem Serum eines HBV/HDV-infizierten Patienten in Hamburg isoliert wurde (im Folgenden HDV-1p genannt, Zugriffsnummer NCBI: OL825606), der später eine anhaltende HDV-Repression erreichte (Giersch et al. 2021a), eine Wirksamkeit von peg-IFN α in Bezug auf die HDV-Replikation in stabil HBV- und HDV-infizierten immundefizienten humanisierten Mäusen belegt werden (Giersch et al. 2017). Die intrahepatische Menge an sowohl genomischer und antigenomischer HDV-RNA, repräsentativ für die HDV-Replikation, sowie die Anzahl Hepatitis D Antigen (HDAg)-positiver Hepatozyten konnte nach 4-wöchiger Behandlung in zuvor über 10 Wochen lang ko-infizierten Mäusen mit stabiler Virämie deutlich reduziert werden (Giersch et al. 2017).

HDV-1p wurde daraufhin im Vorfeld dieser Dissertation sequenziert, kloniert und in vivo im humanisierten Mausmodell auf die Interferonsensitivität getestet und mit HDV-1cc und HDV-3 verglichen (Giersch et al. 2021a, Hendricks 2022, Hermanussen 2021). Auch hier zeigte sich ein Ansprechen auf peg-IFN α des neuen Virusstammes. Während 6 Wochen nach HDV-1p-Superinfektion stabil HBV-infizierter Mäuse etwa 42 % HDAg-positive Hepatozyten ausgemacht wurden, waren es nach peg-IFN α -Behandlung über 4 Wochen lediglich 4 % und es trat eine starke Reduktion der HDV-Virämie ein (Giersch et al. 2021a) und auch HDV-3-infizierte Mäuse zeigten einen deutlichen Abfall der intrahepatischen HDV-RNA (Hendricks 2022, Hermanussen 2021). Im Vergleich dazu sank in HDV-1cc-infizierten Mäusen zwar die HBV-Viruslast, peg-IFN α hatte jedoch keinen Effekt auf die HDV-Parameter (Giersch et al. 2021a). Diese Daten sind 2023 zusammen mit einem Teil der in dieser Arbeit dargestellten Zellkulturversuche in einer Publikation veröffentlicht worden (Giersch et al. 2023). Ziel dieser Dissertation ist es, den HDV-1p-Stamm weiter zu charakterisieren und das Ansprechen auf IFN α in vitro zu evaluieren. Da sich in den Mäusen bei HDV-1p-Infektion nebenbefundlich zudem eine Reduktion der Expression des Rezeptors NTCP (Natrium Taurocholate ko-transportierendes Polypeptid) bei Therapie mit peg-IFN α gezeigt hatte (Giersch et al. 2023), wurde auch die Messung der Expression in vitro durchgeführt.

PHHs stellen derzeit den Goldstandard in Bezug auf die HDV-Zellkultur dar und bieten insbesondere den Vorteil einer erhaltenen angeborenen Immunantwort (Lee et al. 2023). Da die Infektionsraten von HBV und HDV in PHHs in vitro jedoch eher gering ausfallen und

sehr von Qualität und Herkunft der Hepatozyten abhängen (Lee et al. 2023), wurde für diese Fragestellung zunächst ein neues Zellkulturmodell genutzt, in welchem bereits in vivo stabil HDV- und/oder HBV-infizierte humane Hepatozyten aus humanisierten Mäusen isoliert, in Zellkultur gebracht und dann in vitro mit IFN α behandelt wurden. Dieses Modell hat sich im Vorfeld bereits zur Untersuchung der HBV-Infektion (Bockmann et al. 2021a) und einer zusätzlichen in vitro durchgeführten HDV-Superinfektion (Bockmann et al. 2021b) bewährt. Im Anschluss folgte ein herkömmlicher Versuch mit kryokonservierten PHHs.

Es ergaben sich folgende Ziele der Arbeit:

1. Das beschriebene Zellkulturmodell um in vivo ko-infizierte PHHs erweitern.
2. Die IFN α -Sensitivität von HDV-1p in Zellkultur in bereits in vivo infizierten PHHs im Rahmen einer Ko- oder Superinfektion belegen.
3. Die IFN α -Sensitivität von HDV-1p und HDV-1cc in vitro im Rahmen einer Monoinfektion in kryokonservierten PHHs vergleichen, um das Ansprechen auf IFN α auch in einem Standard-Modell, das für andere Arbeitsgruppen zugänglich ist, zu zeigen.
4. Den Einfluss von IFN α auf die NTCP-Expression in HDV-infizierten PHHs prüfen.
5. Neue Informationen zum Wirkmechanismus von IFN α im Rahmen der HDV-Infektion beitragen und Hypothesen zum Resistenz-Mechanismus von HDV-1cc gegenüber IFN α formulieren.

2. Einleitung

2.1 Das Hepatitis-D-Virus

Bereits 1977 wurde ein neues virales Antigen in Lebern von Hepatitis-erkrankten Patient:innen identifiziert, wobei zunächst unklar war, ob es sich dabei um eine HBV-Variante oder ein eigenständiges Pathogen handelt. Einige Jahre später wurde eine zugehörige RNA identifiziert und zum Genom des neuartigen Hepatitis-Delta-Virus (HDV) erklärt (Rizzetto 1983, Rizzetto et al. 1980b). Als Satellitenvirus benötigt dieses das Hepatitis-B-Virus (HBV) als Helfervirus, indem es sein Oberflächenprotein, das Hepatitis B surface Antigen (HBsAg), für seine eigene Hülle verwendet (Ponzetto et al. 1984, Rizzetto et al. 1980b). Im Volksmund wird HDV daher gelegentlich auch als "Huckepack-Virus" bezeichnet (Der Spiegel 1984).

2.1.1 Struktur und Replikation

Das HDV-Genom besteht aus einer zirkulären, kovalent geschlossenen Einzelstrang-RNA negativer Polarität (Chen et al. 1986, Kos et al. 1986, Wang et al. 1986), je nach Genotyp bestehend aus 1668 bis 1697 Nukleotiden (Le Gal et al. 2017), und ist somit das kleinste derzeit bekannte human-pathogene Virus. Seine Struktur besitzt Ähnlichkeit zu einigen pflanzlichen Erregern, den sogenannten Viroiden (Wang et al. 1986). Aufgrund von über 70 % Basenpaarungen besitzt die HDV-RNA die Fähigkeit, sich selbst in eine unverzweigte, stäbchenförmigen Struktur zu falten (Kuo et al. 1988).

Im Rahmen der HDV-Replikation liegt das HDV-Genom in insgesamt drei verschiedenen RNAs vor. Über den sogenannten double-Rolling-Circle-Mechanismus wird die genomische RNA (Minus-Strang) zunächst in einen vollständig komplementären, antigenomischen RNA-Strang (Plus-Strang) abgeschrieben, welcher dann wiederum als Vorlage für eine neue genomische RNA dient. Dies geschieht ohne Bildung von DNA-Zwischenprodukten (Lai 2005, Negro et al. 1989). Da HDV keine eigene Polymerase kodiert, werden zur Replikation die RNA-Polymerasen der Wirtszelle genutzt (Greco-Stewart et al. 2009, Li et al. 2006, MacNaughton et al. 2002, 1991). Die einzige enzymatische Aktivität des HDV selbst besteht aus einer Sequenz auf sowohl genomischer als auch antigenomischer RNA, welche als Ribozym fungiert und die RNA während der Replikation spaltet (Lucifora und Delphin 2020, Sharmeen et al. 1988).

Die antigenomische RNA beinhaltet zudem ein offenes Leseraster (englisch: *open reading frame*, ORF) für eine 0,8-kb große, lineare mRNA, die das einzige durch HDV selbst produzierte Protein kodiert, das Hepatitis D Antigen (HDAg) (Weiner et al. 1988). Dieses weist eine HDV-spezifische RNA-bindende Aktivität auf (Chang et al. 1988) und formt stabile Ribonukleoprotein-Komplexe (Abbildung 2) mit der genomischen HDV-RNA (Ryu et al. 1993). Dabei werden zwei Varianten des Antigens unterschieden (Bergmann und Gerin 1986): das *small* HDAg (S-HDAg, 24 kDa, 195 Aminosäuren) fördert die Replikation (Kuo et al. 1989), während das *large* HDAg (L-HDAg, 27-kDa, 214 Aminosäuren) diese inhibiert (Chao et al. 1990) und eine wichtige Rolle bei der Assemblierung, also dem Zusammenbau der Proteine und Nukleinsäuren zum fertigen Virus, spielt (Chang et al. 1991). Beide Antigene werden vom gleichen offenen Leseraster kodiert (Weiner et al. 1988) und befinden sich im Zellkern (Chang et al. 1988). Durch eine post-transkriptionelle RNA-Modifikation der antigenomischen RNA, vermittelt durch das Enzym *Adenosindesaminase für RNA* (ADAR), wird das eigentliche Stop-Codon ausgeschaltet (Abbildung 1), sodass das L-HDAg insgesamt 19 zusätzliche Aminosäuren besitzt (Casey und Gerin 1995, Luo et al. 1990, Polson et al. 1998, 1996). Diese beinhalten einen Cystein-Rest am Carboxylterminus, welcher als Prenylierungssignalsequenz (Glenn et al. 1992, Otto und Casey 1996) für die spätere Behüllung mit dem HBsAg notwendig ist (siehe Abschnitt 1.1.2).

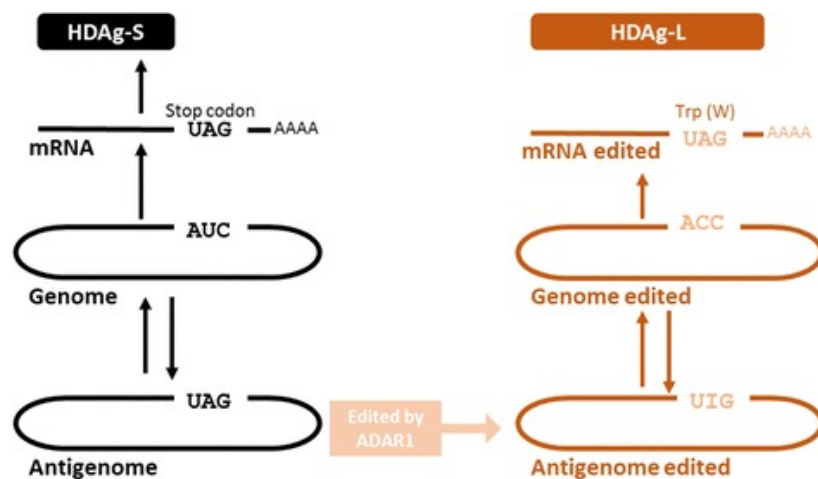


Abbildung 1: Entstehung des Large Delta Antigen (L-HDAg)

Eine ADAR1-vermittelte RNA-Modifikation führt zu einem Basenaustausch von Adenosin durch Inosin im ursprünglichen Stop-Codon. In der dem L-HDAg entsprechenden mRNA

befindet sich nun ein Tryptophan anstelle des Stop-Codons, sodass einige zusätzliche Aminosäuren angehängen werden können und das L-HDAg entsteht (Botelho-Souza et al. 2017).

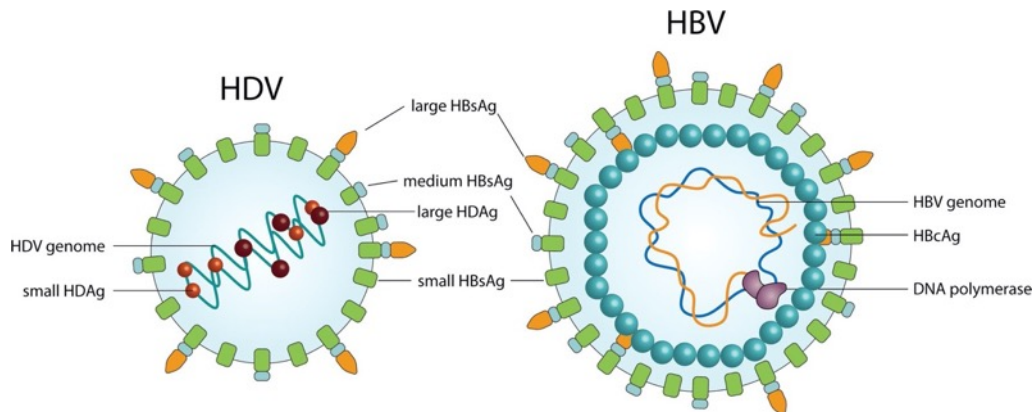


Abbildung 2: Schematische Darstellung von HDV und HBV

Das Hepatitis-D-Virus beinhaltet lediglich das HDV-Genom sowie das small und large HDAg. Die Hülle besteht, ebenso wie die des HBV, aus den drei unterschiedlich großen HBsAg, welche HDV im Rahmen der Virus-Assemblierung erhält (Giersch und Dandri 2015).

2.1.2 Lebenszyklus

HDV gelangt, genauso wie HBV, über das *Sodium Taurocholate ko-transportierende Polypeptid* (englisch: *Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide*, NTCP) in den Hepatozyten. Dies ist ein Gallensäuretransporter, der physiologischerweise Gallensalze aus portalvenösem Blut in den Hepatozyten aufnimmt (Stieger 2011) und hauptsächlich in der Leber exprimiert wird, was den Hepatotropismus von HDV erklärt (Yan et al. 2012). Dabei ist das große HBsAg, welches eine zusätzliche preS1-Region mit einem myristoylierten N-Terminus enthält, für die spezifische Rezeptorbindung an der basolateralen Hepatozytenmembran verantwortlich (Meier et al. 2013, Ni et al. 2014). Nach Aufnahme des Virus in die Zelle, die über eine Interaktion von NTCP mit unter anderem dem epidermalen Wachstumsfaktor (englisch: *epidermal growth factor*, EGFR) (Iwamoto et al. 2019) und dem Interferon-induzierten Transmembran-Protein 3 (IFITM3) (Palatini et al. 2022) vermittelt wird, verliert das Virus seine Hülle und der HDV-RNP-Komplex wird gesteuert durch das HDAg (Chou et al. 1998, Tavanetz et al. 2002) in den Zellkern transportiert. Dort findet die oben beschriebene Replikation mit Bildung von genomischer und antigenomischer RNA sowie Produktion des HDAg statt, sodass neue HDV-RNPs geformt werden können. Damit diese

ihre Hülle erhalten können, folgt zunächst eine Prenylierung des L-HDAg, eine posttranslationale Modifikation, die zu einer kovalenten Bindung einer Farnesylgruppe an den Cysteinrest des L-HDAg führt (Glenn et al. 1992). Katalysiert wird dies durch eine Farnesyltransferase, die derzeit Forschungsgegenstand hinsichtlich der HDV-Therapie ist (siehe Kapitel 1.3.6). Nach Verlassen des Zellkerns, vermittelt durch ein Exportsignal des L-HDAg (Lee et al. 2001), erlaubt die Farnesylgruppe schließlich eine direkte Interaktion zwischen dem L-HDAg und dem HBsAg (Hwang und Lai 1993) im endoplasmatischen Retikulum. Nach Durchlaufen des endoplasmatischen Retikulums und Golgi-Apparates kann das behüllte HDV den Hepatozyten als vollständiges Virus zur Re-Infektion weiterer Hepatozyten verlassen (Negro und Lok 2023) (Abbildung 3). Daneben findet auch eine Zellteilungsvermittelte HDV-Ausbreitung statt (Giersch et al. 2019).

Obwohl die HDV-Replikation HBV-unabhängig verläuft und HDV auch ohne Helfervirus neue genomische und antigenomische RNA sowie HDAg produzieren kann, kann HDV jedoch nur mitsamt seiner aus HBsAg bestehenden Hülle aus der Zelle sezerniert werden und neue Hepatozyten befallen (Sureau und Negro 2016). In einer Studie mit humanisierten Mäusen konnte HDV zwar auf intrazellulärer Ebene für mindestens 6 Wochen auch ohne HBV verbleiben, eine Ausbreitung des Virus auf weitere Hepatozyten fand hingegen erst nach der Superinfektion mit HBV statt (Giersch et al. 2014). Ob das Verlassen der Zelle jedoch rein auf das Zusammenspiel von HDV mit HBV als Helfervirus beschränkt ist, ist derzeit ungeklärt (Stephenson-Tsoris und Liang 2023). Auf experimenteller Ebene konnte nachgewiesen werden, dass in humanisierten Mäusen außer HBV auch das Hepatitis-C-Virus (HCV) und in vitro das Dengue-Virus, West-Nil-Virus und ein Vesikulovirus als Helfervirus fungieren können und eine HDV-Verbreitung ermöglichen (Perez-Vargas et al. 2019). Bislang konnte in mehreren Screening-Studien hingegen nur ein einziger Patient identifiziert werden, bei dem sich trotz aktiver HDV-Infektion weder HBsAg noch Antikörper gegen HBV nachweisen ließen (Cappy et al. 2021, Chemin et al. 2021, Pflüger et al. 2021b). Eine kürzlich publizierte Studie zeigte außerdem, dass HDV auch in Abwesenheit von HBV in Speicheldrüsen von am Sjögren-Syndrom erkrankten Menschen gefunden werden kann (Hesterman et al. 2023, Weller et al. 2016). Inwiefern sich diese Ergebnisse auf die bislang angenommene These auswirkt, dass HDV ein HBV-abhängiges, hepatotropes Virus ist, ist bislang unklar.

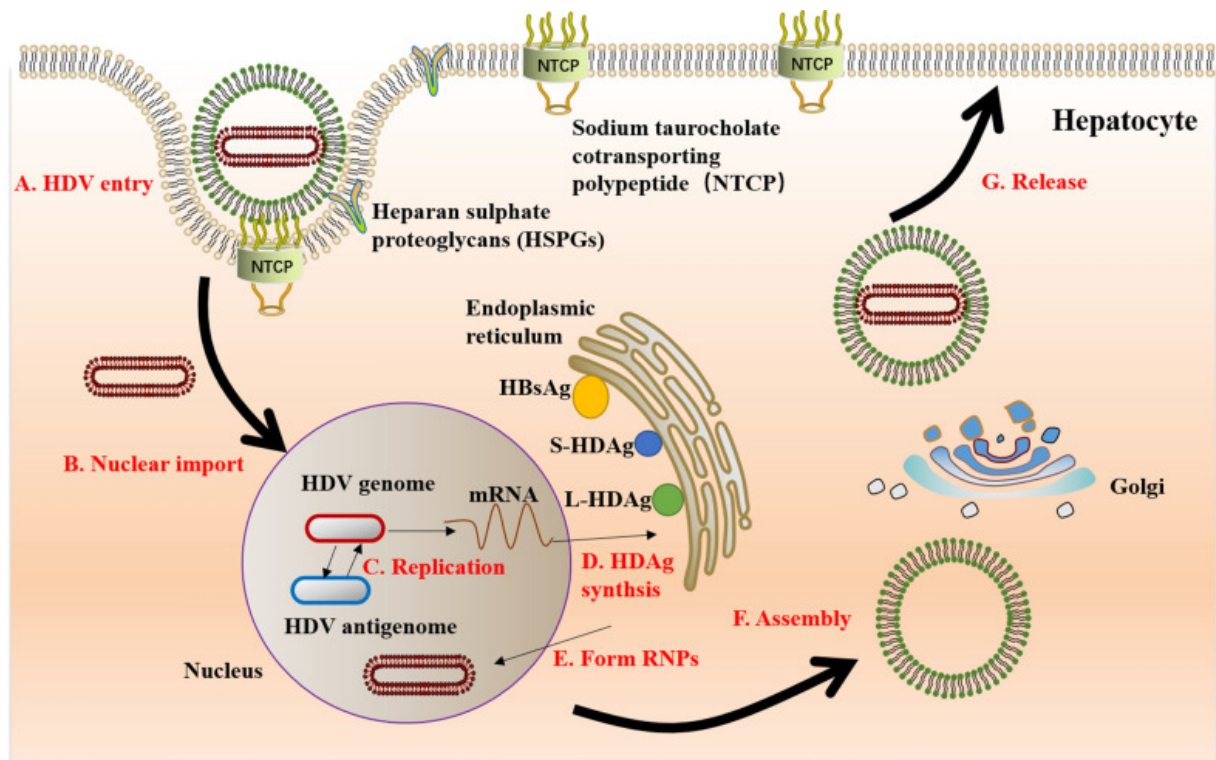


Abbildung 3: HDV-Lebenszyklus

A) Eintritt in die Zelle über NTCP. B) Verlust der Hülle und Transport zum Zellkern. C) Replikation im Zellkern. D) Transport der mRNA zum endoplasmatischen Retikulum und Synthese des HDAg. E) Rücktransport des HDAg in den Zellkern und Bildung von RNP-Komplexen mit HDV-RNA. F) Assemblierung des Virus über Interaktion des HDV-RNP-Komplexes mit HBsAg. G) Durchlaufen des Golgi-Apparates und HDV-Sekretion zur Infektion neuer Hepatozyten (Chen et al. 2021).

2.1.3 Epidemiologie

Die Frage, wie viele Menschen derzeit wirklich an HDV erkrankt sind, ist nicht abschließend geklärt. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (englisch: *World Health Organization*, WHO) zufolge, basierend auf einer Meta-Analyse mit über 120.000 HBsAg-Träger:innen (Stockdale et al. 2020), beläuft sich der Anteil HDV-positiver HBsAg-Träger:innen auf derzeit knapp 5 % (WHO 2023). Besonders hohe Prävalenzen bei HBsAg-Träger:innen fanden sich dabei geographisch betrachtet vor allem in der Mongolei (36,9 %) sowie in Moldawien, West- und Mittelafrrika (über 10 %). Weltweit belief sich die Zahl der anti-HDV-positiven Menschen der globalen Bevölkerung auf 0,16 %, also etwa 12 Millionen Menschen (Stockdale et al. 2020). Allerdings wurden diese, verglichen mit der Prävalenz der HBV-Infektion in Höhe von etwa 254 Millionen Menschen im Jahr 2022 (WHO 2024), eher

niedrigen HDV-Infektionsraten von anderen Studien nicht bestätigt. So konnte in einer anderen Meta-Analyse eine positive HDV-Serologie bei über 13 % aller HBsAg-Träger:innen festgestellt werden, was einer Gesamtzahl an 48 bis 60 Millionen HDV-Infizierten weltweit entspricht (Miao et al. 2020). Eine weitere Publikation stellte eine generelle Prävalenz in der Gesamtbevölkerung von 0,98 % fest, was etwa 62 bis 72 Millionen Menschen mit HDV-Infektion gleich kommt (Chen et al. 2019). Insgesamt sind die Prävalenzen möglicherweise so unklar, weil es sich bei der HDV-Infektion um eine allgemein unterdiagnostizierte Erkrankung handelt (Papatheodoridi und Papatheodoridis 2021). Dennoch zählt die HDV-Infektion zu den *orphan diseases* oder seltenen Erkrankungen (Ghany 2023).

Seit Einführung der HBV-Impfung in den 1990er-Jahren ließ sich vor allem in einkommensstarken Ländern ein deutlicher Rückgang der HDV-Neuinfektionen feststellen, weshalb in diesen Regionen heutzutage vor allem ältere Generationen von der Erkrankung betroffen sind (Rizzetto et al. 2021). Gleichzeitig kam es in den letzten Jahren durch zunehmende Flüchtlingsbewegungen und Immigration in den letzten Jahren von häufig jüngeren Menschen aus Ländern mit endemischen HDV-Prävalenzen auch in Europa wieder zu einem leichten Anstieg (Coppola et al. 2019, Vlachogiannakos und Papatheodoridis 2020). Eine kürzlich publizierte Studie aus Italien berichtet jedoch von gleichbleibenden Prävalenzen in den letzten beiden Jahrzehnten (Salpini et al. 2024). Die Prävalenz von HDV-Antikörpern unter HBsAg-Träger:innen variiert beispielsweise in Italien zwischen 6,4 % bei Italiener:innen und 26,4 % bei Nicht-Italiener:innen (Stroffolini et al. 2020) und in Frankreich entfallen bis zu 90 % aller HBV/HDV-Koinfektionen auf Immigrant:innen aus endemischen Gebieten (Lotto et al. 2022). Inwiefern sich zudem der teilweise erschwerte Zugang zum Gesundheitssystem einschließlich HBV-Impfungen im Rahmen der COVID-19-Pandemie seit 2020 besonders in endemischen Regionen auf die HDV-Infektionsraten sowie Infizierte an sich auswirkt, ist bislang nicht hinreichend erforscht. Es wird jedoch ein weiterer Anstieg der Infektionszahlen erwartet (Sagnelli et al. 2021).

2.1.4 Genotypen

HDV wird derzeit in 8 unterschiedliche Genotypen (HDV-1 bis HDV-8) eingeteilt, bei denen jeweils eine Sequenzhomologie der Genome von über 80 % vorliegt, sowie verschiedene Subgenotypen, die sogar um 84 % bis über 90 % übereinstimmen (Le Gal et al. 2017). Die Genotypen variieren bezüglich der geographischen Verteilung (Abbildung 4) und haben Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung. HDV-1 ist der weltweit mit Abstand am häufigsten vertretene Genotyp, er macht knapp 90 % aller HDV-Infektionen aus (Stockdale et al.

2020). In Europa, Nordamerika und dem Nahen Osten sowie Australien stellt er die vorherrschende Variante dar und ist mit vielseitigen Krankheitsverläufen verbunden (Coppola et al. 2019, Jackson et al. 2018). Die Genotypen HDV-2 und HDV-4, welche eher mit milderen Verläufen assoziiert sind (Wu 2006), finden sich überwiegend in Asien, während die Ausbreitung von HDV-3 vornehmlich auf Südamerika, genauer gesagt das Amazonasbecken, begrenzt ist (Roulot et al. 2020). Obwohl HDV-3 als aggressivster Genotyp gilt und häufiger mit fulminanter Hepatitis einhergeht (Casey et al. 1996, Melo Da Silva et al. 2019), zeigt dieser Genotyp tendenziell ein gutes Ansprechen auf Interferon alpha (IFN α) (Borzacov et al. 2016). Eine Studie in humanisierten Mäusen konnte eine im Vergleich zu HDV-1 deutlich schnellere Ausbreitungskinetik und höhere Replikationsraten von HDV-3 feststellen, was ein möglicher Grund für die schwereren klinischen Verläufe sein könnte (Giersch et al. 2021c). HDV-5 hingegen, ein Genotyp, der genauso wie HDV-6 bis HDV-8 bislang überwiegend in Afrika beziehungsweise afrikanisch-stämmigen Personen zu finden ist, ist mit eher milderen klinischen Verläufen, niedrigerem Zirrhose-Risiko und einem ebenfalls besseren Ansprechen auf die Therapie mit IFN α assoziiert (Spaan et al. 2020).

Aufgrund der oben bereits erwähnten ansteigenden Migration zeigt sich eine zunehmende Ausbreitung der Genotypen, weg von einem streng auf einen Kontinent limitierten Ausbreitungsmuster, wie es noch vor wenigen Jahren für bestimmte Genotypen angenommen wurde. Dies gilt beispielsweise für die Genotypen 5 bis 7 und Genotyp 3, die bereits in Europa gefunden werden konnten (Beghin und Meier-Stephenson 2023, Chen et al. 2019), sowie für Genotyp 8 in Südamerika (Mello et al. 2023). Grundsätzlich stellt die Verbreitung der Genotypen eine mögliche zusätzliche zukünftige Herausforderung dar (Chen et al. 2019).

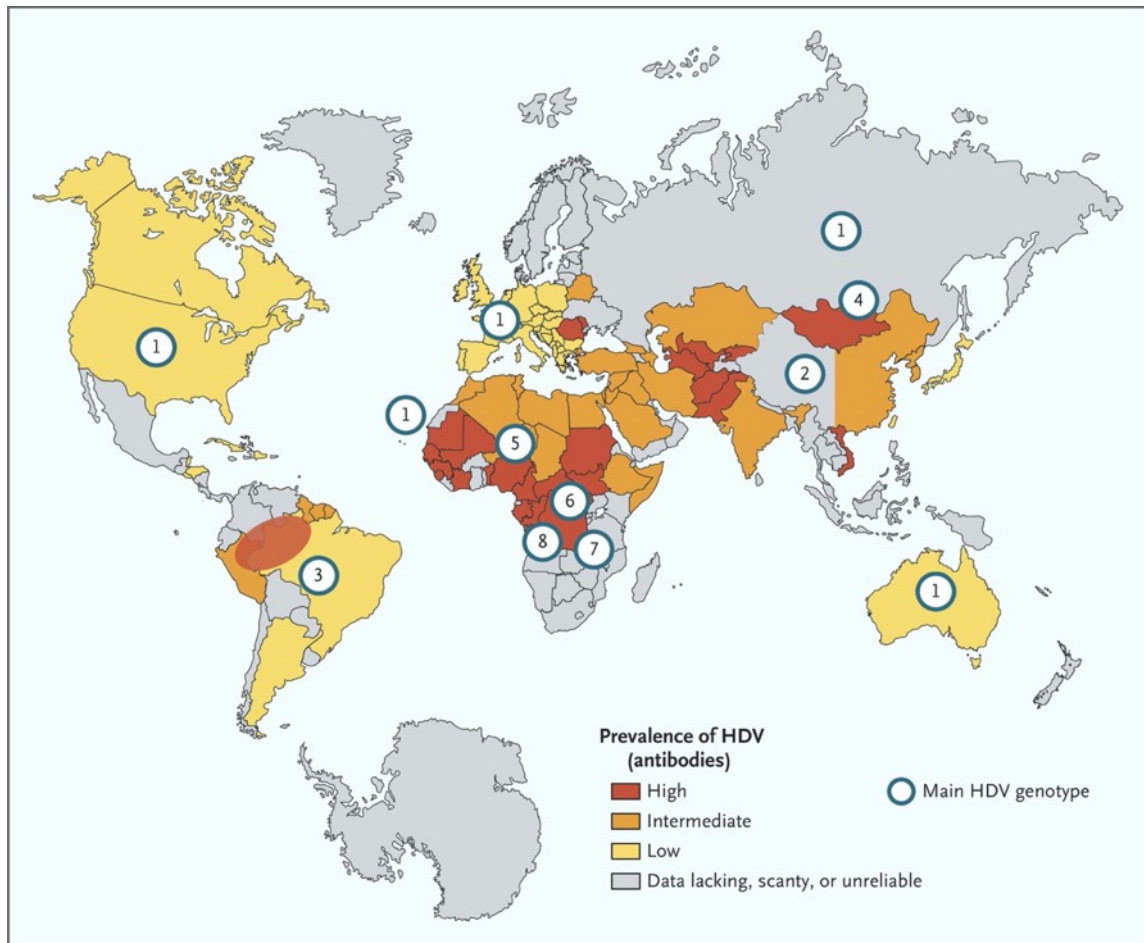


Abbildung 4: Prävalenz von anti-HDV Antikörpern in den letzten 10 Jahren

Die höchsten Prävalenzen finden sich in Afrika (insbesondere Kamerun, Gabun, Zentralafrikanische Republik und Demokratische Republik Kongo) sowie in Asien (insbesondere Mongolei, Usbekistan, Tadschikistan, Kirgisistan und Pakistan). In Europa finden sich hohe Prävalenzen in Moldawien und Rumänien und in Südamerika im Amazonasbecken. Eingezeichnet ist der jeweils regional vorherrschende HDV-Genotyp dargestellt (Asselah und Rizzetto 2023).

2.2 Das Hepatitis-B-Virus

Beim Hepatitis-B-Virus (HBV) handelt es sich um ein 42 Nanometer großes DNA-Virus, zugehörig zu den Hepadnaviren (Seeger und Mason 2000). Seine Entdeckung in den 1960er-Jahren wurde später mit dem Nobelpreis ausgezeichnet (Al-Mahtab et al. 2020). Es ist heute immer noch von starker Relevanz, weil laut WHO 2022 etwa 254 Millionen Menschen weltweit Hepatitis B erkrankt waren, bei einer Inzidenz von 1,2 Millionen Neuinfektionen jährlich (WHO 2024). Während es im Erwachsenenalter in 95 % der Fälle zu

einer Spontanremission kommt, entwickeln bis zu 90 % der Neugeborenen und 25 bis 30 % der Kleinkinder nach Infektion eine chronische Hepatitis B (Terrault et al. 2018).

HBV besteht aus einer einzigen zirkulären, teilweise doppelsträngigen DNA (englisch: *relaxed circular DNA*, rcDNA), die sich aus etwa 3200 Nukleotiden zusammensetzt und kovalent an eine virale Polymerase gebunden ist. Gemeinsam mit dem sogenannten Hepatitis B core Protein (HBcAg) bildet sie ein Nukleokapsid. Dieses wird ummantelt von einer lipidhaltigen Hülle, bestehend aus den drei unterschiedlichen großen Oberflächenproteinen, dem *small*, *middle* und *large* Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) (Tsukuda und Watashi 2020). Da HDV keine eigene Hülle bilden kann, nutzt es das HBsAg für seine eigene Oberfläche (siehe Abschnitt 1.1.2).

Das HBV-Genom wird derzeit in 10 verschiedene Genotypen (A bis J) eingeteilt (Chen et al. 2023). Dabei ist die häufigste Paarung mit HDV die Ko- bzw. Superinfektion von HBV-D mit HDV-1, wobei nicht klar ist, ob es sich um eine höhere Präferenz der Viren zueinander oder lediglich um eine statistische Verteilung bei Endemizität beider Genotypen handelt (Beghin und Meier-Stephenson 2023).

Genau wie HDV gelangt HBV über den NTCP-Rezeptor auf der Hepatozytenmembran in den Intrazellulärraum (Yan et al. 2012). Nach Transport in den Zellkern kommt es dann zur Bildung der in Form eines Minichromosoms vorliegenden kovalent geschlossenen zirkulären DNA (englisch: *covalently closed circular DNA*, cccDNA), welche als entscheidendes Schlüssel-molekül für die Persistenz des Virus im Hepatozyten fungiert, indem sie als Vorlage aller im Folgenden gebildeten viralen RNAs dient (Dandri et al. 2021). Der Metabolismus dieser HBV-RNAs wird, im Kontext einer zusätzlichen Ko- oder Superinfektion, von HDV supprimiert (Lucifora et al. 2023). Zu den HBV-RNAs gehören: 1. subgenomische RNAs zur Bildung der Oberflächenproteine sowie des Hepatitis B X Proteins (HBx), welches unter anderem Replikations-regulierende Funktionen übernimmt (Sivasudhan et al. 2022); 2. eine precore RNA zur Bildung des sekretorischen Hepatitis B e Antigens (HBeAg), welches immunmodulierende Funktionen übernimmt (Kramvis et al. 2018) und als diagnostischer Marker für anhaltende Replikation und Infektiosität dient (Collier und Schillie 2018); 3. eine prä-genomische RNA (pgRNA), die wiederum zur Bildung von HBcAg und HBV-Polymerase führt (Dandri et al. 2021, Nassal 2015). Über Bindung der Polymerase und eine anschließende reverse Transkription der pgRNA sowie Komplexbildung mit HBcAg entstehen wieder neue Nukleokapside, die im endoplasmatischen Retikulum vom HBsAg umhüllt werden und den Hepatozyten wieder verlassen können (Urban et al. 2010) (Abbildung 5).

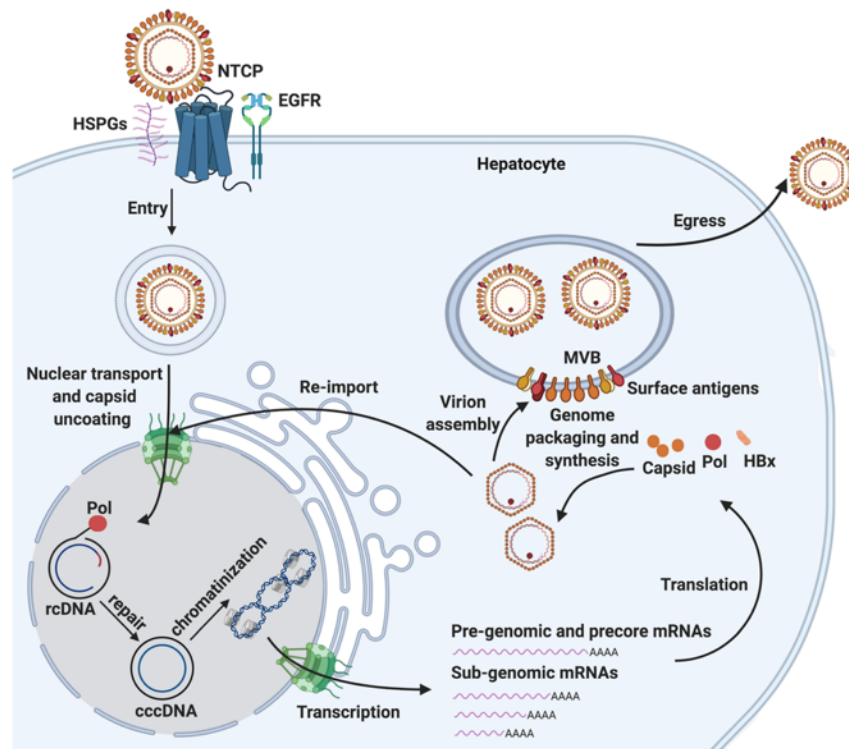


Abbildung 5: HBV-Lebenszyklus

HBV gelangt über NTCP sowie Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) und EGFR in die Zelle. Im Zellkern wird aus rcDNA eine cccDNA geformt. Aus dieser werden alle verschiedene RNAs zur Produktion der viralen Proteine und Polymerase abgelesen. Nach Bindung der Polymerase an die pgRNA kommt es zur Herstellung neuer rcDNA und Bildung von Nukleokapsiden. Diese werden entweder zurück in den Zellkern transportiert und treiben dort die Replikation voran oder im multivesikulären Körper (MVB) behüllt, um die Zelle wieder als vollständiges Virus zu verlassen (Wei und Ploss 2021).

Derzeit wird die chronische Hepatitis B mit Nukleosid- oder Nukleotidanaloga (NUCs, zum Beispiel Tenofovir, Entecavir, Lamivudin oder Telbivudin), die die virale Transkriptase beziehungsweise Polymerase hemmen und so die Bildung von HBV-pgRNA und von HBV-DNA verhindern (Martinez et al. 2020), sowie pegyliertem Interferon alpha (peg-IFN α) behandelt (Cornberg et al. 2021). Eine vollständige Heilung mit NUCs oder peg-IFN α ist aufgrund der hohen Stabilität der cccDNA derzeit jedoch nicht möglich (Martinez et al. 2020). Therapieziel ist daher die funktionelle HBV-Heilung, also ein anhaltender Verlust des HBsAg mit oder ohne Serokonversion zu anti-HBs-Antikörpern sowie eine nicht nachweisbare HBV-DNA im Serum. Nach peg-IFN α -Therapie tritt diese in 2-3 % der Fälle nach einem Jahr und 3-8 % der Fälle bis 3 Jahre nach Behandlungsende auf, unter bis zu 10-jähriger NUC-Therapie in bis zu 5 % (Wong et al. 2022). Daher kommen auch unterschiedliche Präparate in klinischen Studien zum Einsatz, zum Beispiel Modulatoren für den Kapsid-

Zusammenbau (englisch: *capsid assembly modulators*, CAMs), die die Bildung des HBV-Nukleokapsides verhindern sollen, oder Nukleinsäure-Polymere, die den Transport von HBsAg-Partikeln hemmen. Eine *small interfering* RNA (wörtlich übersetzt: kleine eingreifende RNA) und Antisense-Oligonukleotide binden an die HBV-RNA, was zur Spaltung dieser RNA führt, sodass die Translation gestoppt wird. Außerdem werden der Entry-Inhibitor Bulevirtid sowie verschiedene Immunmodulatoren untersucht (Dusheiko et al. 2023, Kim et al. 2022). Einige dieser Wirkstoffe sind auch Gegenstand der Forschung zur HDV-Therapie und werden in Abschnitt 1.3.6. ausführlicher dargestellt.

2.3 HDV-Infektion

2.3.1 Klinik

Die HDV-Infektion ist die aggressivste Form der Virushepatitis und führt deutlich häufiger zu Komplikationen als die reine HBV-Monoinfektion (Bockmann et al. 2020, Niro et al. 2010, Patel et al. 2019, Wranke et al. 2023). Sie kann entweder als gleichzeitige HBV/HDV-Koinfektion oder als Superinfektion in bereits HBV-infizierten Personen auftreten (Smedile et al. 1982). Bei der Koinfektion kommt es nach einer Inkubationszeit von 3 bis 7 Wochen, je nach Höhe des HDV-Titers im Infektionsmedium (Ahn und Gish 2014), meist zu eher unspezifischen Symptomen einer akuten Hepatitis. Diese umfassen Appetitlosigkeit, Übelkeit und allgemeine Abgeschlagenheit sowie gelegentlich einen Ikterus (Farci und Niro 2012). Im Falle einer HDV-Superinfektion ist tendenziell auch eine fulminante Hepatitis mit Leberversagen und damit einhergehender Koagulopathie, Ikterus und hepatischer Enzephalopathie möglich (Farci und Niro 2012).

Während die Koinfektion in der Regel zu 95 % spontan ausheilt, kommt es bei der Superinfektion in über 90 % der Fälle zu einem chronischen Verlauf (Negro und Lok 2023) (Abbildung 6). Der Schweregrad der Klinik hängt dabei einerseits mit dem HDV-Genotyp zusammen (siehe oben), andererseits aber auch unabhängig vom Genotyp mit dem Herkunftsland (Roulot et al. 2020). Zu den weiteren Faktoren, die den Krankheitsverlauf beschleunigen, zählen vor allem eine hohe HDV-Viruslast (Kamal et al. 2020, Romeo et al. 2014) sowie hohe HBV-Konzentrationen, risikoreicher Alkoholkonsum, Übergewicht und Diabetes mellitus (Negro und Lok 2023).

In einer aktuellen retrospektiven Studie von Wranke et al. (Wranke et al. 2023) mit insgesamt 175 Patient:innen entwickelten etwa 18 % mit einer HBV-Monoinfektion eine Leberzirrhose, wohingegen diese in etwa 62 % der Patient:innen bei zusätzlicher HDV-Infektion auftrat. 45 % der HDV-infizierten Patient:innen hatten diese Zirrhose bereits zum Zeitpunkt

der Erstvorstellung. Die sekundären Komplikationen wie eine hepatische Dekompensation (31 % HDV, 7 % HBV), Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (35 % HDV, 18 % HBV), Notwendigkeit einer Lebertransplantation und/oder frühzeitiges Versterben (22 % HDV, 5 % HBV) traten bei HDV-Erkrankten insgesamt ebenfalls häufiger und früher auf, was sich jedoch primär auf die früher und häufiger vorkommende Zirrhose zurückführen lässt und unabhängig von HDV an sich auftritt (Wranke et al. 2023). Diese Daten decken sich mit früheren Publikationen anderer Autor:innen, welche beispielsweise vom HDV-assoziierten Auftreten einer Leberzirrhose in 10 bis 15 % innerhalb von 2 Jahren und 70 bis 80 % innerhalb von 5 bis 10 Jahren (Da et al. 2019, Negro 2014) sowie jährlichen Inzidenzen in Höhe von 4 % für die Zirrhose und 2,8 % für das hepatozelluläre Karzinom bei persistierender HDV-Replikation berichten (Romeo et al. 2009). In einer weiteren Studie erlitten 127 von 188 Patient:innen beziehungsweise 67 % eine Zirrhose, von denen wiederum 13 % ein hepatozelluläres Karzinom entwickelten (Niro et al. 2010). Umgekehrt gehen etwa 18 % der mit Hepatitis B assoziierten Leberzirrhosen und 20 % der HBV-assoziierten hepatozellulären Karzinome auf eine HDV-Infektion zurück (Stockdale et al. 2020).

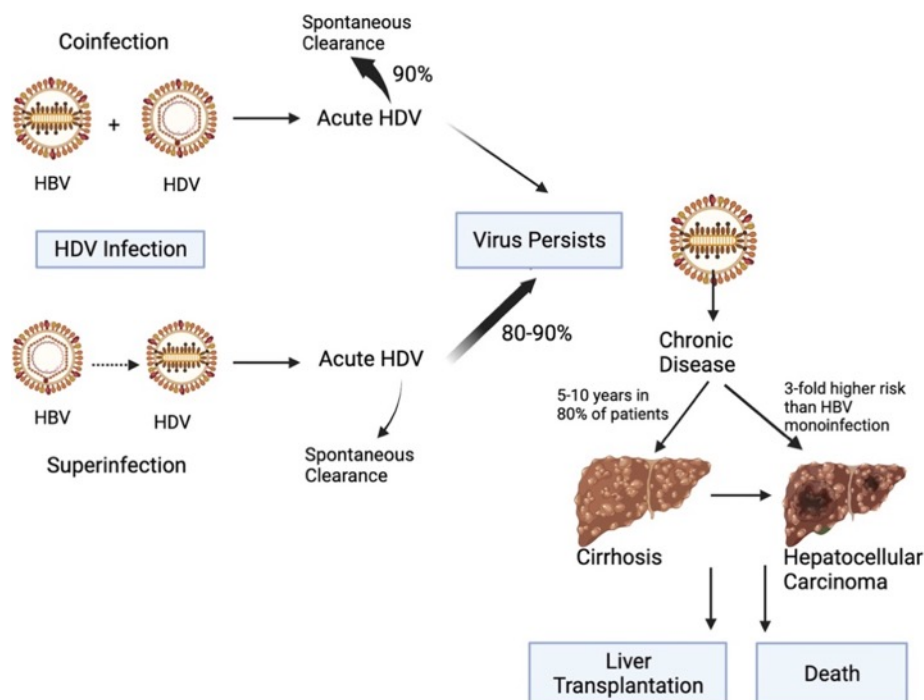


Abbildung 6: Natürlicher Verlauf einer HDV-Infektion

Während die Koinfektion in den meisten Fällen selbstlimitierend verläuft, entwickeln sich etwa 80-90 % aller Superinfektionen zur chronischen Hepatitis. Diese führt zur Leberzirrhose und geht mit einem deutlich erhöhten Risiko für das hepatozelluläre Karzinom sowie Notwendigkeit einer Lebertransplantation und Tod einher (Kushner 2023).

2.3.2 Risikofaktoren und Transmission

Da HDV wie bereits erläutert HBV als Helfervirus benötigt, um in die Zelle zu gelangen und diese zu verlassen, erfolgt die Ansteckung entweder als gemeinsame HBV/HDV-Koinfektion, oder es findet eine HDV-Superinfektion auf Basis einer bereits bestehenden HBV-Infektion statt. Dabei reichen bereits kleine Mengen des Virus für eine Infektion aus (Ponzetto et al. 1987). Die Übertragung erfolgt ausschließlich parenteral über Kontakt zu infektiösen Körperflüssigkeiten. In Industriestaaten stehen heutzutage 70 % aller HDV-Neuinfektionen in Zusammenhang mit intravenösem Drogenabusus sowie risikoreichen Sexualpraktiken (Negro und Lok 2023). Dies spiegelt sich auch in den insgesamt deutlich höheren HDV-Prävalenzen bei intravenösen Drogenkonsument:innen, Männern, die Sex mit Männern haben (MSM) und Sexarbeiter:innen wider. Auch eine bereits bestehende HCV- oder HIV-Infektion birgt ein höheres Risiko für eine HDV-Infektion (Chen et al. 2019, 2022, Stockdale et al. 2020). Obwohl sich im Allgemeinen zudem höhere Prävalenzen bei Hämodialyse-Empfänger:innen finden (Stockdale et al. 2020), kommen in Industrieländern aufgrund des standardisierten Screenings von Blutprodukten heutzutage so gut wie keine iatrogenen Übertragungen im Rahmen von Bluttransfusionen oder Dialysen vor (Hughes et al. 2011). In endemischen Regionen gelten kontaminierte Medizinprodukte hingegen weiterhin als Hauptrisikofaktor für eine Neuinfektion (Baatarkhuu et al. 2017), ebenso wie das Zusammenleben mit HDV-infizierten Personen (François-Souquière et al. 2016, Niro et al. 1999). Theoretisch ist zudem auch eine vertikale HBV/HDV-Koinfektion von HDV-positiver Mutter auf das Kind möglich. Diese kommt jedoch im Vergleich zur HBV-Monoinfektion nur in absoluten Ausnahmefällen vor (Aliasi-Sinai et al. 2023) und hängt vermutlich mit einem häufig spontan auftretenden Rückgang der Viruslast von HBV und HDV während der Schwangerschaft sowie heutzutage üblicher präventiver aktiver und passiver Immunisierung des Neugeborenen zusammen (Sellier et al. 2018).

2.3.3 Screening

Während die 2023 veröffentlichten Leitlinien der European Association of the Liver (EASL) eine Testung aller HBsAg-Träger:innen auf anti-HDV-Antikörper sowie wiederholt bei klinischer Verschlechterung und bekannter Hepatitis B oder weiterhin vorhandenem Ansteckungsrisiko empfehlen (Brunetto et al. 2023), ist eine Testung laut den zuletzt 2018 veröffentlichten Leitlinien der American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) nur für Menschen mit hoher HDV-Prätestwahrscheinlichkeit indiziert, also unter anderem Drogenkonsument:innen, MSM, Immigrant:innen aus endemischen Regionen und HIV- be-

ziehungsweise HCV-infizierte Personen (Terrault et al. 2018). Derzeit diskutiert und in einigen Kliniken bereits angewandt werden sogenannte Reflex-Testungen, also die unmittelbare anti-HDV-Messung bei positivem HBsAg, welche die diagnostizierten Infektionen in einer aktuellen Studie um das 5-Fache erhöhen konnten (Palom et al. 2022). Andere Autor:innen schlagen sogar die doppelte Reflex-Testung bei allen HBV-Neuinfektionen vor, bei der sich bei positivem anti-HDV noch eine sofortige HDV-RNA-Messung anschließt (Razavi et al. 2023). Die EASL rät jedoch vor einer allgemein ausgesprochenen Empfehlung zu weiteren Kosten-Nutzen-Untersuchungen (Brunetto et al. 2023). Klar ist aber, dass die zeitnahe Testung auf HDV-Antikörper auch insofern wichtig ist, als dass eine verspätete Diagnostik eine deutlich schlechtere Prognose mit sich bringt (Kamal et al. 2024) und eine umgekehrt rechtzeitig gestellte Diagnose auch die frühzeitige Tertiärprävention - also Vermeidung der bereits dargestellten Risikofaktoren wie Diabetes, Übergewicht oder Alkoholkonsum - zur Verhinderung einer schnellen Krankheitsprogression ermöglicht (Razavi et al. 2023).

2.3.4 Diagnostik

Die serologischen Parameter, die bei der Diagnosestellung einer HDV-Infektion von Relevanz sind, beinhalten zum einen das HBsAg und anti-HBc Antikörper zur Feststellung einer HBV-Infektion sowie zum anderen HDV-Antikörper und HDV-RNA. Eine akute HBV/HDV-Koinfektion ist dabei serologisch über das gleichzeitige Vorhandensein von HBsAg, anti-HBc-IgM und HDV-RNA definiert. Allerdings sollte hier berücksichtigt werden, dass der Anstieg der HDV-RNA teilweise erst verzögert stattfindet und somit eine wiederholte Testung sinnvoll sein kann (Negro und Lok 2023). Um eine Koinfektion von einer akuten HDV-Superinfektion - insbesondere bei Patient:innen, von denen kein vorheriger HBsAg-Status bekannt ist - abzugrenzen, kann Anti-HBc-IgM herangezogen werden. Während bei der Koinfektion meist hohe Werte gemessen werden können, sind diese bei der Superinfektion - die meist auf Boden einer bereits chronischen HBV-Infektion entsteht - eher niedrig oder gar nicht vorhanden. Zudem kommt es häufig zur Suppression der HBV-DNA im Rahmen einer HDV-Superinfektion (Brunetto et al. 2023).

Die HDV-Antikörper, welche im Rahmen des Screenings (siehe Abschnitt 1.3.3) meist zuerst gemessen werden, werden in anti-HDV-IgM und -IgG unterteilt. Während anti-HDV-IgM etwa 2 bis 3 Wochen nach Symptombeginn messbar ist (Koh et al. 2019) und, im Falle der akuten Koinfektion, etwa 2 Monate messbar bleibt, kommt es erst deutlich später zur Produktion von anti-HDV-IgG Antikörpern, welche jedoch auch nach ausgeheilten Infektion lebenslang persistieren (Aragona et al. 1987). Bei Vorhandensein von HDV-Antikörpern

muss im Anschluss also immer eine HDV-RNA-Messung erfolgen, um eine abgelaufene von einer aktiven HDV-Infektion zu differenzieren (Olivero und Smedile 2012). Von einer chronischen HDV-Infektion spricht man bei Nachweis von HDV-Antikörpern über 6 Monate und gleichzeitig nachweisbarer HDV-RNA oder immunhistochemischem Nachweis des HDAg (Koh et al. 2019), beziehungsweise von einer chronischen Hepatitis D bei nachweisbarer HDV-RNA und erhöhter Alanin-Aminotransferase (ALT) oder Nachweis einer Leberfibrose (Negro und Lok 2023).

Theoretisch kann auch das HDAg im Serum gemessen werden. Da es jedoch in der Regel nur bis zu etwa zwei Wochen während der frühen Infektionsphase messbar bleibt, ist das HDAg kein zuverlässiger Marker und somit kaum klinisch relevant (Buti et al. 1986, Negro und Lok 2023). Bei Immundefizienz kann das HDAg auch längere Zeit messbar sein (Grippon et al. 1987).

Unabhängig von der Höhe der HDV-Viruslast sollte auch eine Bestimmung vom HBeAg, einem Marker für die Infektiosität bei HBV-Infektion (Miller 1980), beziehungsweise des anti-HBe-Status sowie der HBV-Viruslast im Sinne der HBV-DNA erfolgen, da eine aktive HBV-Infektion das Outcome der Hepatitis D verschlechtern kann (Brunetto et al. 2023). Um bei Feststellen einer HDV-Infektion zudem eine mögliche, begleitende Leberzirrhose zu erkennen, kommen verschiedene nicht-invasive Untersuchungsmethoden in Frage. Dazu gehören zum einen bildgebende Verfahren wie Sonographie, Computertomographie oder Magnetresonanztomographie (Brunetto et al. 2023), zum anderen kann die Lebersteifigkeit beispielsweise mittels transienter Elastographie evaluiert werden (Sandmann et al. 2024). Auch verschiedene Fibrose-Scores wie der AST/Thrombozyten-Ratio Index (APRI) (Grecu et al. 2023) oder der HDV-spezifische Delta-4 fibrosis score (D4FS) (Da et al. 2020), die unter anderem die Aminotransferasen oder Thrombozytenzahlen mit einbeziehen, können berücksichtigt werden. Eine histologische Einordnung mittels Leberbiopsie stellt derzeit zwar weiterhin den Goldstandard zur genauen Diagnostik bei Lebererkrankungen dar, ist aufgrund der Invasivität jedoch primär indiziert, wenn die nicht-invasiven Verfahren keine klaren Zirrhose darlegen konnten und die Biopsie zu einer optimierten Behandlung beitragen kann (Brunetto et al. 2023). Bei fortgeschrittener Fibrose oder Zirrhose sollte im Anschluss ein halbjährliches HCC-Screening mittels Lebersonographie und gegebenenfalls die Bestimmung des Tumormarkers alpha-Fetoprotein erfolgen (Brunetto et al. 2023, Galle et al. 2018).

2.3.5 Prävention

Der derzeit einzige Weg, eine HDV-Infektion sicher zu verhindern, ist die Impfung gegen Hepatitis B (Karayiannis et al. 1991). In Deutschland werden auf Empfehlung der Ständigen Impfkommission (STIKO) standardmäßig alle Säuglinge im Alter von 2, 4 und 11 Monaten mit einem Totimpfstoff gegen Hepatitis B geimpft (Robert Koch-Institut 2023). Bei Personen mit erhöhtem Ansteckungsrisiko, wie bei Immundefizienz im Rahmen einer Systemerkrankung oder geplanter Immunsuppression, engem Kontakt zu HBsAg-Träger:innen, risikoreichem Sexualverhalten, intravenösem Drogenkonsum oder Aufenthalt in Untersuchungshaft, sowie bei Personen mit möglicher beruflicher Exposition in unter anderem Krankenhäusern, Gefängnissen und Asylheimen, oder vor Reisen in endemische Regionen, wird zudem auch eine Impfung im Erwachsenenalter empfohlen (Robert Koch-Institut 2023). Eine Postexpositionsprophylaxe mit HBV-Immunglobulinen wird beispielsweise für Neugeborene mit HBV- und gegebenenfalls auch HDV-positiver Mutter im Rahmen einer Simultanimpfung verabreicht. Auch nach Nadelstichverletzungen oder Kontakt zu infektiösen Körperflüssigkeiten ist unter Umständen eine passive Immunisierung indiziert (Robert Koch-Institut 2023). Da bislang kein HDV-spezifischer Impfstoff zur Verfügung steht, ist die einzige Maßnahme, eine HDV-Superinfektion bei bereits chronisch HBV-infizierten Personen zu verhindern, das Vermeiden von ungeschütztem Geschlechtsverkehr und Kontakt zu infektiösen Körperflüssigkeiten von HDV-infizierten Personen (Negro und Lok 2023). Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte für einen Impfstoff, der sowohl einen Teil des HBsAg als auch des L-HDAg beinhaltet, eine sichere Verhütung der HDV-Superinfektion in HBV-infizierten Mäusen darlegen, indem unter anderem HDAg-spezifische T-Zellen induziert werden (Burm et al. 2023). Dies könnte in Zukunft auch chronische HBV-Träger:innen vor einer HDV-Infektion schützen (Burm et al. 2023).

2.3.6 Therapie

Sowohl die Leitlinie der EASL als auch die der Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) empfehlen die Evaluierung einer Therapie bei allen HDV-positiv getesteten Patient:innen. Insbesondere bei hoher entzündlicher Aktivität, fortgeschrittener Fibrose und Leberzirrhose sollte eine antivirale Therapie erfolgen, ansonsten sollten für jede:n Patient:in individuelle Therapieentscheidungen erfolgen (Brunetto et al. 2023, Cornberg et al. 2021). Die allgemeinen Therapieziele beziehungsweise Endpunkte für klinische Studien wurden 2022 gemeinsam von EASL und AASLD neu definiert. Dazu zählen allgemein die funktionelle Heilung von HBV (HBsAg-Verlust und Serokonversion zu anti-HBs, siehe Abschnitt 1.2) sowie eine entweder nicht nachweisbare

HDV-RNA oder zur Erhaltungstherapie alternativ eine Reduktion der HDV-RNA um mindestens 2-log in Kombination mit einer Normalisierung der Transaminasen (Ghany et al. 2023).

Die in der HBV-Therapie eingesetzten NUCs, die über eine Hemmung der HBV-Polymerase eine Virusreduktion erzielen sollen, zeigten im Kontext einer HDV-Infektion in der Monotherapie keinen signifikanten Abfall der HDV-Aktivität (Kabaçam et al. 2012, Niro et al. 2005, Wedemeyer et al. 2011, Yurdaydin et al. 2008, 2002) und sind teilweise sogar mit einem schlechteren klinischen Verlauf assoziiert (Scheller et al. 2021). Daher spielen NUCs in der HDV-Therapie derzeit eher eine Rolle zur Behandlung der zugrundeliegenden HBV-Infektion und sollten bei hohen HBV-Spiegeln und Leberzirrhose mit gleichzeitig vorhandener HBV-DNA beziehungsweise bei dekompenzierter Zirrhose HBV-DNA-unabhängig verabreicht werden (Brunetto et al. 2023). Zur Zeit umfasst das im klinischen Alltag angewandte Behandlungsregime der chronischen Hepatitis D daher lediglich die beiden Medikamente peg-IFN α und Bulevirtid (Brunetto et al. 2023, Cornberg et al. 2021).

IFN α , ein Typ I Interferon, wird bereits seit den 1980er-Jahren zur Behandlung der Hepatitis D eingesetzt (Rizzetto et al. 1986). IFN α wirkt sowohl durch die Aktivierung des Immunsystems über den JAK-STAT-Signalweg und Erzeugung einer antiviralen Aktivität (Abbildung 7) mittels Induktion verschiedener Interferon-stimulierter Gene (ISG) (Giersch et al. 2017, Pestka et al. 2004) als auch über eine Destabilisierung der HDV-RNA während der Zellteilung und somit Unterbindung einer Zellteilungs-vermittelten viralen Ausbreitung (Zhang et al. 2022). Seit den 2000er-Jahren wird die pegylierte Form eingesetzt (peg-IFN α), die über eine verlängerte Halbwertszeit einen retardierten Effekt bewirkt und daher nur einmal wöchentlich appliziert werden muss (Kozlowski und Harris 2001). Aus Mangel an hinreichenden Alternativen wird peg-IFN α zurzeit weiterhin als off-label Medikament ohne Zulassung der amerikanischen oder europäischen Arzneimittelbehörden zur Behandlung der Hepatitis D eingesetzt. Die EASL und DGVS empfehlen eine Therapiedauer von 48 Wochen (Brunetto et al. 2023, Cornberg et al. 2021). Dabei ist das Ansprechen auf die Therapie jedoch nicht zufriedenstellend: laut einer 2021 publizierten Metaanalyse war die HDV-RNA knapp 6 Monate nach Abschluss einer mindestens 48 Wochen andauernden Behandlung mit peg-IFN α in nur durchschnittlich 29 % der Fälle negativ (Abdrakhman et al. 2021), von denen zudem etwa 50 % bei 48-wöchiger und 22 % bei 96-wöchiger Therapie einen späten HDV-Rückfall erlitten (Anastasiou et al. 2024, Heidrich et al. 2014). Die Kombination aus peg-IFN α mit den NUCs Adefovir (Wedemeyer et al. 2011) und Tenofovir (Wedemeyer et al. 2019) erbrachte keine Verbesserung der Ansprechraten.

Der Eintrittshemmer Bulevirtid, das erste gezielt zur Behandlung der HDV-Infektion entwickelte Medikament, wurde 2020 von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (englisch: *European Medicines Agency*, EMA) zur Behandlung der chronischen HDV-Infektion zugelassen (EMA 2024). Dabei handelt es sich um ein synthetisches Lipopeptid, welches durch eine Ähnlichkeit zum myristoylierten N-Terminus der preS1-Region des HBsAg (siehe Abschnitt 1.2) eine kompetitive Hemmung des NTCP-Rezeptors erzielt und so den Eintritt von HDV in die Zelle verhindert (Soriano et al. 2023) (Abbildung 7). Die aktuell andauernde, insgesamt für 144 Wochen geplante Phase 3 Studie MYR-301 konnte nach 48 Wochen einen kombinierten virologischen (HDV-RNA-Reduktion um mehr als 2-log oder nicht nachweisbare HDV-RNA) und biochemischen (ALT-Normalisierung) Effekt bei 45 bis 48 % der mit Bulevirtid behandelten Patient:innen erreichen. Dabei lag bei bis zu 20 % der Patient:innen, je nach Dosierung, eine nicht nachweisbare HDV-RNA vor (Wedemeyer et al. 2023). Bei Patient:innen, bei denen kein Rückgang der Viruslast eintrat, wurden in vitro keine Resistenzen gegenüber Bulevirtid festgestellt, sodass ein anderer, noch unbekannter Mechanismus für die virale Persistenz trotz Einnahme des Entry-Inhibitors zu existieren scheint (Hollnberger et al. 2023). Auch wurde, im Gegensatz zu IFN α (siehe Abschnitt 1.1.4), eine Wirksamkeit von Bulevirtid gegenüber allen HDV-Genotypen nachgewiesen (Mateo et al. 2023). Anhand von Leberbiopsien aus unterschiedlichen Bulevirtid-Studien ließ sich neben einer Reduktion der HDV-positiven Hepatozyten außerdem ein Rückgang von intrahepatischen Zeichen der Leberentzündung bei Bulevirtid-Einnahme beobachten (Allweiss et al. 2024).

Verschiedene, zum Teil noch andauernde Phase 2 Studien wie auch Real-Life-Studien, die außerhalb von randomisierten kontrollierten Studien stattfinden, untersuchen zudem die Wirksamkeit einer Kombinationstherapie aus peg-IFN α und Bulevirtid. Es konnte bislang gezeigt werden, dass die Kombination im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie eine stärkere Reduktion der HDV-RNA erzielt (Asselah et al. 2024a, Bogomolov et al. 2016, De Ledinghen et al. 2021, Lampertico et al. 2022). Auffällig war außerdem ein Rückgang oder gar Verlust des HBsAg lediglich bei Personen, die die Kombinationstherapie aus beiden Präparaten erhielten, was potentiell zur langfristigen Reduktion der HDV-RNA nach Beendigung der Behandlung notwendig gewesen sein könnte (Lampertico et al. 2022, Wedemeyer et al. 2020). Ein möglicher therapeutischer Synergismus beider Medikamente könnte in der Bulevirtid-assoziierten Inhibition der extrazellulären Ausbreitung sowie Interferon-induzierten Hemmung der Zellteilungs-vermittelten HDV-Ausbreitung bestehen (Asselah und Rizzetto 2023).

Weitere, in derzeit laufenden Phase 3 Studien untersuchte Medikamente zur Behandlung einer Hepatitis D umfassen pegyliertes Interferon lambda (peg-IFN λ), welches in einer kürz-

lich publizierten Phase 2 Studie zwischen 16 % und 36 % HDV-Negativität nach Behandlung erreichen konnte (Etzion et al. 2023), und Lonafarnib, ein oral verfügbarer Farnesyl-Transferase-Inhibitor, der die Prenylierung des L-HDAg hemmt (Abbildung 7). Dies verhindert die Interaktion zwischen L-HDAg und HBsAg und reduziert so die Sekretion von infektiösen HDV-Partikeln (Koh et al. 2015). Lonafarnib wird gemeinsam mit Ritonavir verabreicht, einem Cytochrom P450 3A4-Inhibitor, welcher in den Metabolismus von Lonafarnib eingreift und höhere Leberkonzentrationen bei gleichzeitig niedriger Dosierung und somit besserer Verträglichkeit erlaubt (Yurdaydin et al. 2018). Die Kombination von Lonafarnib mit peg-IFN α führte in einer kleinen Phase 2 Studie bei 8 von 9 Patient:innen zu einer erheblichen Reduktion der Viruslast oder nicht nachweisbarer HDV-RNA (Yurdaydin et al. 2022). In einer anderen Phase 2 Studie, die die Kombination aus Lonafarnib, Ritonavir und peg-IFN λ testete, erreichte man bei 96 % der Patient:innen eine Reduktion der HDV-RNA um mindestens 2-log und bei 42 % nicht nachweisbare HDV-RNA-Spiegel (Koh et al. 2020).

In den vorläufigen Ergebnissen einer Phase 2 Studie konnte insbesondere nach 24 Wochen eine Reduktion der HDV-Viruslast sowie Normalisierung der hepatischen Transaminasen durch Verabreichung des neutralisierenden monoklonalen HBsAg-spezifischen Antikörpers Tobevibart (VIR-3434), auch in Kombination mit der *small interfering RNA* (siRNA, wörtlich übersetzt kleine eingreifende RNA) Elebsiran (VIR-2218), gezeigt werden (Asselah et al. 2024b). In verschiedenen kleineren Phase 1 und 2 Studien erforschte medikamentöse Ansätze umfassen zudem die Verabreichung von Nukleinsäure-Polymeren (englisch: *nucleic acid polymers*, NAPs), welche die Bildung und Sekretion von HBsAg inhibieren (Abbildung 7) und eine direkte Interaktion mit dem HDAg eingehen und so, in Kombination mit peg-IFN α , eine anhaltende HDV-Negativität erreichen können (Bazinet et al. 2020, 2017). Außerdem wird die Wirksamkeit einer weiteren siRNA (JNJ-3989, NCT04535544) geprüft, die die HBV-RNA-Replikation stört (Yuen et al. 2023) (Abbildung 7) und so zu einer reduzierten HDV-Viruslast führen soll, sowie von Nivolumab (NCT04638439), einem sogenannten Checkpoint-Inhibitor des PD-1-Rezeptors (*programmed cell death protein 1*), der im Rahmen der HBV-Infektion eine gesteigerte HBV-spezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort bewirkt (Gane et al. 2019). Für beide klinischen Studien sind derzeit noch keine Ergebnisse publiziert.

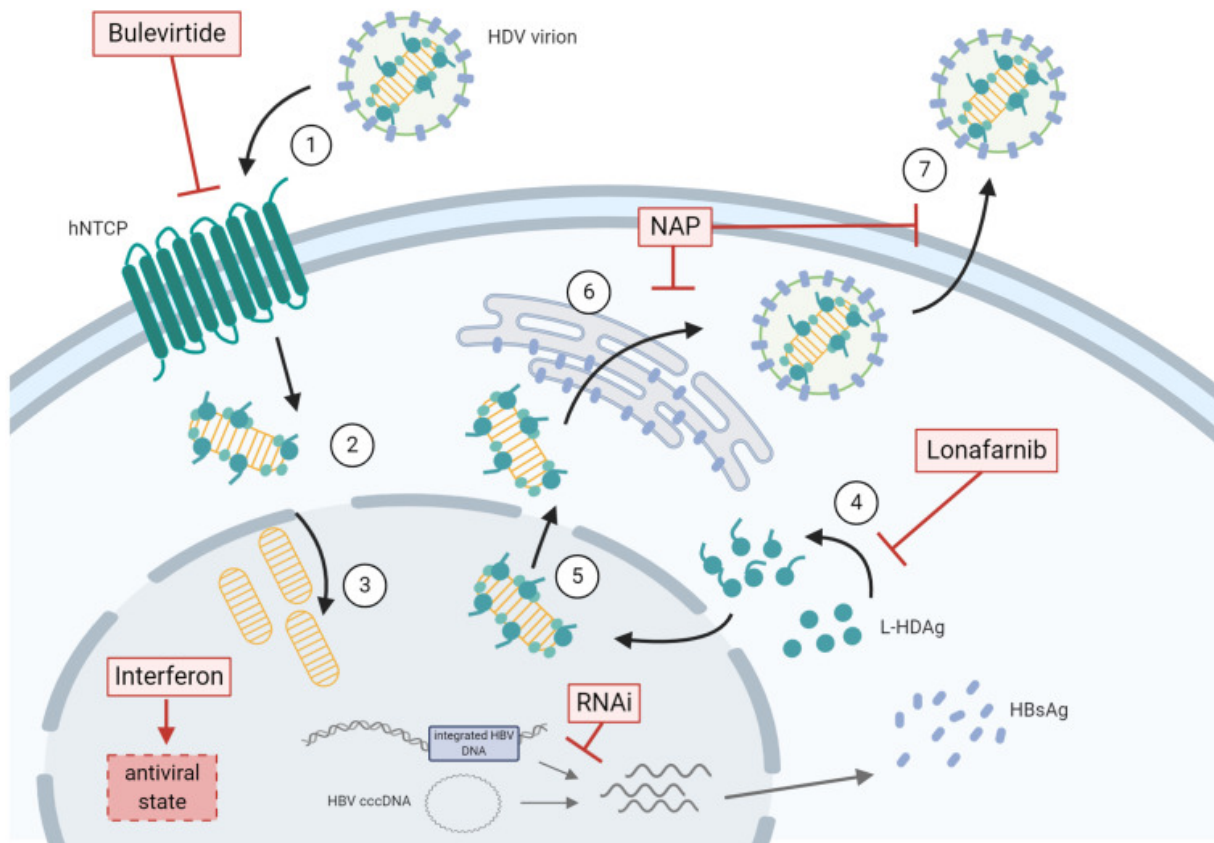


Abbildung 7: Therapeutische Ansätze zur Behandlung der chronischen Hepatitis D und entsprechender Wirkort im HDV-Lebenszyklus

1) Bindung an NTCP und Eintritt in die Zelle, 2) Transport des RNP-Komplexes zum Zellkern, 3) HDV-Replikation, 4) Prenylierung des L-HDAg, 5) Bildung neuer HDV-RNPs, 6) Interaktion mit HBsAg, 7) HDV-Sekretion. Darstellung der verschiedenen Eingriffsorte von Medikamenten zur Behandlung der Hepatitis D (Sandmann und Cornberg 2021).

Die derzeit im präklinischen Rahmen getesteten Präparate zielen größtenteils entweder auf die Immunantwort in der Bekämpfung der HDV-Infektion oder den HDV-Eintritt in den Hepatozyten. Zu den in vivo getesteten Substanzen gehören unter anderem Ergosterolperoxid, ein Sterol, welches durch Bindung an NTCP und somit als Entry-Inhibitor die frühen Schritte der HDV-Infektion in vivo verhindert (Chiou et al. 2024), sowie mit ubiquitiniertem S-HDAg-beladene Exosomen, die in HDV-replizierenden Mäusen über die Induktion der zellulären Immunantwort ebenfalls eine Reduktion der Viruslast erreichen konnten (Yao et al. 2021). In vitro wurde für den Farnesoid-X-Rezeptor, ein nukleärer Rezeptor, der in den Gallensäuremetabolismus involviert ist, eine Reduktion von HDV-Replikation sowie der Sekretion und Infektiosität von HDV-Virionen nachgewiesen (Legrand et al. 2023). Upadacitinib, ein normalerweise in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis eingesetzter spezifischer Inhibitor der Januskinase 1 (JAK1), die eine Schlüsselrolle in der Immunantwort

auf virale Infektionen spielt, konnte in HDV-infizierten primären humanen Hepatozyten ebenfalls die virale Replikation hemmen (Heuschkel et al. 2024). Auch Immunmodulatoren, die den NF- κ B-Signalweg induzieren, zeigten in vitro einen Effekt in der HDV-Reduktion (Michelet et al. 2022), genauso wie ein Ciclosporin A Analogon (Liu et al. 2021).

Abgesehen von der medikamentösen Therapie kommt als Ultima Ratio bei Leberversagen, Zirrhose oder hepatozellulärem Karzinom zudem eine Lebertransplantation in Frage (Martini et al. 2022). Durch die prophylaktische Gabe von NUCs und HBsAg-Immunglobulinen konnten die HDV-Reinfektionsraten dabei auf maximal 13 % reduziert werden, wobei in vielen europäischen Studien überhaupt keine Rückfälle auftraten (Martini et al. 2022). Für das Überleben nach der Transplantation wurde in einer aktuellen Studie aus den USA kein Unterschied zwischen HBV- und HBV/HDV-infizierten Transplantierten festgestellt (Kushner et al. 2021).

2.4 Immunreaktion bei HDV-Infektion

Das Immunsystem wird allgemein in die angeborene und die adaptive Immunantwort aufgeteilt und ist für die Bekämpfung viraler Infektionen zuständig. Die erste Abwehrreaktion bei Kontakt zu einem viralen Pathogen wird dabei vom angeborenen Immunsystem übernommen. Dieses setzt sich aus natürlichen physikalischen Barrieren wie Haut und Schleimhaut, Zellen wie Makrophagen, Granulozyten und natürlichen Killerzellen sowie im Blut zirkulierenden Proteinen zusammen und ruft eine unspezifische Immunantwort mit Aktivierung von inflammatorischen Zytokinen hervor. Zu diesen Zytokinen gehören unter anderem Interferone, Interleukine, Chemokine und Tumornekrosefaktoren, die - neben der Induktion eines antiviralen Zustandes mit Auslösung einer Apoptose und beispielsweise Hemmung von Virusreplikation und -ausbreitung - auch das adaptive Immunsystem (Synonym: erworbenes Immunsystem) aktivieren können. Dieses setzt sich aus T- und B-Lymphozyten zusammen und erzeugt eine Antigen-spezifische Immunantwort (Beltra und Decaluwe 2016, Hoblos und Kefalakes 2023, Jarczak und Nierhaus 2022, Kaur und Secord 2019, Medzhitov und Janeway 2000).

Auch im Rahmen der HDV-Infektion spielt das Immunsystem eine wesentliche Rolle. Die exakten Mechanismen der HDV-abhängigen Immunantwort und wie diese mit der Pathogenese der chronischen HDV-Infektion zusammenhängen sind bislang jedoch nicht abschließend geklärt (Jung et al. 2020b).

2.4.1 Erkennen von HDV-RNA und Auslösung einer Interferon-Sekretion

RNA-Viren werden im Allgemeinen über Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), wie beispielsweise doppelsträngige RNA, die im Menschen physiologischerweise nicht vorkommt, im Zytoplasma des Hepatozyten von den Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR, wörtlich übersetzt etwa Mustererkennungszustoren) erkannt (Zhang und Urban 2021). Zu diesen PRRs gehören unter anderem Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) und RIG-I-ähnliche Rezeptoren (RLRs), welche in das *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), das Melanom-Differenzierungsantigen 5 (MDA5) und *laboratory of physiology and genetics 2* (LGP2) unterteilt werden (Zhang und Urban 2021), wobei im Falle der HDV-Infektion insbesondere die im Zytoplasma lokalisierten MDA5 und LGP2 eine Rolle spielen (Gillich et al. 2023, Zhang et al. 2018). Die Erkennung der PAMPs über die PRRs führt zur Aktivierung des mitochondrialen antiviralen Signalproteins (MAVS), welches wiederum Interferon-Regulationsfaktoren (IRF) und den Transkriptionsfaktor nukleärer Faktor kappa B (NF-κB) aktiviert. Diese wandern in den Zellkern und nehmen dort die Transkription von Interferon Typ I (IFN-α und -β) und Typ III (IFN-λ) vor (Zhang und Urban 2021) (Abbildung 8). Beide Interferone können nach Sekretion über den Januskinasen(JAK)/Signal Transducers and Activators of Transcription(STAT)-Signalweg den ISG-Faktor-3-Komplex aktivieren, der sich aus phosphoryliertem STAT1 und STAT2 sowie IRF-9 zusammensetzt und der, nachdem er in den Zellkern gewandert ist, die Induktion verschiedener Interferon-stimulierter Gene (ISGs) über Bindung der entsprechenden Promotor-Regionen initiiert (Schoggins 2019).

Neben den Hepatozyten könnten zudem Zellen des angeborenen Immunsystems wie dendritische Zellen und Makrophagen zu der Interferon-Produktion im Rahmen der HDV-Infektion beitragen (Ali et al. 2019, Zhang und Urban 2021).

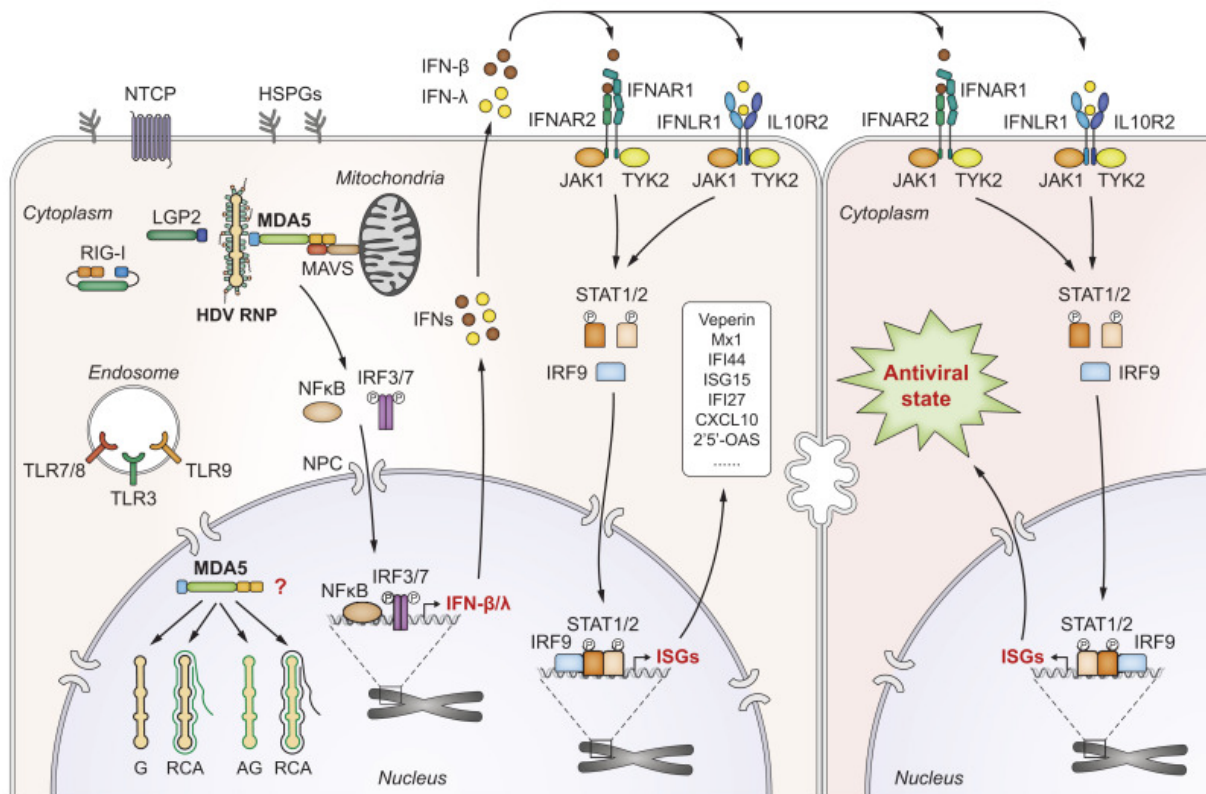


Abbildung 8: Antwort des angeborenen Immunsystems auf eine HDV-Infektion

HDV-RNA wird von MDA5 im Zytoplasma des Hepatozyten erkannt, was zur Aktivierung verschiedener Regulations- und Transkriptionsfaktoren führt. In der Folge kommt es zur Bildung und Sekretion von Interferonen, die an ihre Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden. Durch Aktivierung eines JAK-STAT-Signalweges werden ISGs induziert (Zhang und Urban 2021).

2.4.2 Intrinsische ISG-Induktion und adaptive Immunantwort

ISGs sind im Allgemeinen maßgeblich verantwortlich für die antivirale Immunantwort, indem sie (in seltenen Fällen) die virale Anheftung an die Zelloberfläche hemmen oder (deutlich häufiger) das Eindringen des Virus in die Zelle sowie den Transport zum Zellkern verhindern und die virale Genexpression hemmen (Schoggins 2019). Aufgrund ihrer Abhängigkeit von der Interferon-Signaltransduktion gelten einige ISGs als repräsentativer Marker für die Interferonantwort des angeborenen Immunsystems (Haller et al. 2015).

Im Rahmen der HDV-Infektion konnte in Stammzell-generierten Hepatozyten eine Korrelation zwischen intrazellulärer Menge an HDV-RNA und Interferon- beziehungsweise ISG-Spiegeln hergestellt werden (Lange et al. 2023). Der Effekt von Interferonen auf die HDV-

Replikation scheint jedoch vergleichsweise eher schwach auszufallen, wohingegen von einer Wirksamkeit hauptsächlich im Rahmen der Zellteilung HDV-infizierter Hepatozyten ausgegangen wird (Zhang et al. 2022). Im Vergleich zur HBV-Monoinfektion fällt die intrinsische ISG-Induktion in der HDV-Ko- oder Superinfektion deutlich stärker aus und ist zudem mit der Sekretion von pro-inflammatorischen und pro-fibrinogenen Zytokinen wie dem transformierenden Wachstumsfaktor beta (TGF β), dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) oder dem C-X-C motif Chemokin 10 (CXCL10) assoziiert, was eine mögliche Erklärung für den schwereren klinischen Verlauf der chronischen Hepatitis D sein könnte (Giersch et al. 2015, Usai et al. 2020). CXCL10 dient unter anderem der Rekrutierung von Monozyten, Makrophagen und T-Zellen zum Ort der Entzündung und wird vor allem durch IFN- β und IFN- λ induziert (Makuch et al. 2022). Dies passt zu der Beobachtung, dass im Rahmen der HDV-Infektion nur IFN- β und IFN- λ sezerniert werden, nicht aber IFN- α (Alfaïate et al. 2016, Giersch et al. 2015, Lange et al. 2023, Zhang et al. 2018). IFN- β wiederum scheint zu einer gesteigerten Aktivierung zytotoxischer natürlicher Killerzellen zu führen, was möglicherweise zu den schweren Leberschäden bei HDV-Patient:innen beiträgt (Groth et al. 2023). Bei Schimpansen konnte außerdem gezeigt werden, dass eine gesteigerte CXCL10-Expression mit erhöhten ALT-Spiegeln und Nekroinflammation, also einer Entzündungsreaktion auf nekrotischen Zelltod, einhergeht (Engle et al. 2020). Weitere ISGs, die im Rahmen der HDV-Infektion induziert werden, umfassen - neben vielen weiteren (He et al. 2015) - das Virus-spezifische Myxovirus resistance protein 1 (MX1, Synonym: MXA), eine GTPase, die auf die frühen Schritte im viralen Lebenszyklus verschiedener Negativ-Strang-Viren abzielt (Giersch et al. 2015, Metz et al. 2023, Schoggins 2019), sowie das Interferon-stimulierte Gen 15 (ISG15), welches üblicherweise die virale Translation, die Replikation und den Austritt aus der Zelle hemmt (Schneider et al. 2014). Im Rahmen der Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) wurde ISG15 hingegen eine provirale Aktivität im Sinne einer Förderung der viralen Replikation zugeschrieben (Broering et al. 2010, Sandmann und Wedemeyer 2023). Ob dies auch für die HDV-Infektion zutrifft, ist bislang nicht belegt worden.

Einige der pro-inflammatorischen Zytokine wie TNF α , Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) führen außerdem zur Abnahme der hepatischen NTCP-Expression (Appelman et al. 2021, Zhao et al. 2021), was zu der Beobachtung passt, dass bei chronisch HBV-infizierten Patient:innen mit histologisch hoher entzündlicher Aktivität und folglich hoher kompensatorischer Hepatozyten-Proliferation ebenfalls eine niedrigere NTCP-Expression auftritt (Yan et al. 2019). Für die HDV-Infektion wurde dies bislang jedoch nicht bestätigt.

Zu den Interferon-stimulierten Proteinen gehören außerdem solche, die an der Antigenpräsentation auf der Hepatozytenoberfläche beteiligt sind. Daher werden im Vergleich zur HBV-Monoinfektion bei HDV-Infektion auch mehr HBV-Epitope präsentiert und eine gestei-

gerte Entzündungsreaktion ausgelöst (Oberhardt et al. 2022, Tham et al. 2020). Die hepatische Antigenpräsentation findet über den Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC), auch humanes Leukozytenantigen (HLA) genannt, der Klasse I statt (Oberhardt et al. 2022, Tham et al. 2020), welcher in humanisierten Mäusen durch die HDV-Infektion verstärkt exprimiert wird (Giersch et al. 2015). Daneben findet auch eine Antigenpräsentation über die HLA-Klasse-II, statt, die ausschließlich auf antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen exprimiert werden. Die Antigenpräsentation löst eine Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor aus (Cruz-Tapias et al. 2013), wodurch T-Zellen aktiviert und, kurz gefasst, CD4-positive T-Helferzellen, CD8-positive zytotoxische T-Zellen und Antikörper-produzierende B-Zellen stimuliert werden (Oberhardt et al. 2022). In HDV-positiven Patient:innen wurde eine Akkumulation zytotoxischer CD4-positiver T-Lymphozyten (Oberhardt et al. 2022) und teilweise chronische Aktivierung zytotoxischer CD8-positiver T-Lymphozyten (Hoblos und Kefalakes 2023) beobachtet, was insgesamt zu einer verstärkten Entzündung führt (Oberhardt et al. 2022). Über B-Zellen produzierte HDV-spezifische Antikörper spielen nach derzeitigem Kenntnisstand in der antiviralen Immunreaktion eher eine untergeordnete Rolle und stehen vorrangig als diagnostisches Mittel zur Verfügung (Oberhardt et al. 2022).

2.4.3 Mechanismen zur Umgehung des Immunsystems und viraler Persistenz

Warum die durch HDV-induzierte Immunantwort in der Regel nicht ausreicht, die Infektion zu bekämpfen, ist bisher nicht abschließend geklärt und Forschungsgegenstand der aktuellen Literatur. In einem aktuellen Fallbericht wurde eine Korrelation zwischen einer massiv gesteigerten HDV-Virusaktivität und schwerer Transaminasenerhöhung bei Glucocorticoid-induzierten Immunsuppression hergestellt, was die wichtige Rolle der Immunantwort bei einer HDV-Infektion hervorhebt (Patmore et al. 2023). Trotz einer allgemein gesteigerten T-Zell-Antwort auf die HDV-Infektion reicht die adaptive Immunantwort aber nicht zur Bekämpfung der chronischen Hepatitis aus (Gill 2023). Insbesondere eine Dysfunktionalität CD8-positiver T-Zellen im Rahmen der HDV-Infektion trägt hierzu bei, einerseits bedingt durch eine allgemeine Erschöpfung dieser Zellen und andererseits durch eine Immunevasion des Virus, sodass es gar nicht erst zu einer CD8-Antwort kommt (Oberhardt et al. 2022).

Bezüglich der Antwort des angeborenen Immunsystems scheint die Januskinase 1 (JAK1) im Rahmen der HDV-Infektion zusätzlich zu ihrer Funktion als Teil der oben genannten Signalkaskade auch eine gleichzeitig provirale Rolle einzunehmen, indem sie wesentlich an der Phosphorylierung des HDAg und der HDV-RNA-Replikation beteiligt ist (Heuschkel

et al. 2024). Außerdem wird die Erkennung von HDV über die PRRs von HBV-spezifischen Proteinen (HBx, HBsAg, Polymerase) und dem HDAg gehemmt (Jung et al. 2020a). Während bisherige Zellkultur-Experimente darauf hindeuten, dass das L-HDAg außerdem STAT1 und 2 sowie dessen Phosphorylierung hemmt, was wiederum eine Erklärung für die schlechte Therapieresonanz auf IFN α sein könnte (Jung et al. 2020a, Pugnale et al. 2009), stellte sich in humanisierten Mäusen eine HDV-induzierte Zunahme der STAT1-Expression heraus (Giersch et al. 2015). Zudem wurde kürzlich das Interferon-induzierte Transmembran-Protein 3 (IFITM3) als NTCP-Kofaktor identifiziert, welches möglicherweise von HBV und HDV zum erleichterten Zelleintritt und Verhinderung einer intrazellulären Degradierung durch das Immunsystem zweckentfremdet wird (Palatini et al. 2022).

Ein weiterer möglicher Mechanismus beruht auf der ADAR1 (Hartwig et al. 2006), die ebenfalls zu den Interferon-stimulierten Proteinen gehört und für die Bildung des L-HDAg notwendig ist. Dieses hemmt zwar die Virusreplikation (Jung et al. 2020a), fördert aber auch die Virusassemblierung, sodass es dennoch möglich wäre, dass HDV die viralen Abwehrmechanismen des Interferon-Systems für seinen eigenen Lebenszyklus nutzt (Chida et al. 2023). Antivirale ISGs, die direkt in den HDV-Lebenszyklus eingreifen, wurden bislang nicht identifiziert (Lucifora et al. 2022), was diese Hypothese stützen könnte. In vitro konnte kürzlich außerdem gezeigt werden, dass HDV zu einer anhaltenden Aktivierung des Interferon-Systems führt, was in der Konsequenz zu einer Interferon-Unempfindlichkeit führt und exogen zugeführtes IFN α somit unwirksam macht. Dies wäre eine mögliche Erklärung für das geringe Therapieansprechen auf therapeutisch eingesetztes IFN α (Chida et al. 2023). Zudem kann HDV aufgrund seiner Eigenschaft als RNA-Virus, bei dessen Replikation es zu genomischen Mutationen kommen kann, beispielsweise die Erkennung über in der Bevölkerung weit verbreitete HLA-Moleküle umgehen und so einer Immunantwort entkommen (Jung et al. 2020a, Karimzadeh et al. 2019).

Ein möglicherweise auf eine autoimmune Komponente der chronischen Hepatitis D hinweisendes Phänomen stellt außerdem die erhöhte Prävalenz unspezifischer Autoantikörper im Rahmen der HDV-Infektion dar (Hermanussen et al. 2023). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde eine Assoziation zwischen erhöhten IgG-Spiegeln und HDV-Virämie, Transaminasenerhöhung und Leberfibrose festgestellt. Folglich steht die Hypothese einer polyklonalen B-Zell-Aktivierung als mögliche Erklärung für Schweregrad und Aktivität der HDV-Infektion im Raum. Ihre klinische Relevanz bleibt jedoch noch ungeklärt (Hermanussen et al. 2023).

2.5 HDV-Tiermodelle

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen HDV und HBV, der verschiedenen Infektionsdynamiken und der Immunreaktion sowie zur Testung antiviraler Substanzen in präklinischer Umgebung kommen verschiedene Tiermodelle zum Einsatz. Natürliche Wirte der HBV/HDV-Koinfektion sind dabei neben dem Menschen lediglich Schimpansen (Rizzetto et al. 1980a), die insbesondere in den ersten Jahren nach Entdeckung des Virus wichtige Erkenntnisse lieferten (Gerin 2001), sowie die evolutionär eng mit Primaten verwandten Spitzhörnchen (lateinisch: *Tupaia belangeri*) (Li et al. 1995). Alternativ können durch Transduktion eines NTCP-tragenden viralen Vektors auch Mäuse, Ratten, Hunde, Schweine und Makaken mit HDV infiziert werden. In Walddarmtieren, Hörnchen und Pekingenten kann die HDV-Infektion anstelle von HBV im Beisein anderer verwandter Hepadnaviridae wie beispielsweise dem Woodchuck-Hepatitis-Virus erfolgen (Giersch und Dandri 2021). Aufgrund einiger Nachteile wie erschwerter Verfügbarkeit, hoher Kosten, teils komplizierter Handhabung durch beispielsweise Winterschlaf, gesetzlich regulierter Fallzahlen und starker ethischer Bedenken bezüglich mancher dieser Tiere werden heutzutage jedoch überwiegend praktikablere Mausmodelle zur präklinischen HDV-Forschung genutzt (Aldabe et al. 2015, Giersch und Dandri 2021).

Da der murine NTCP-Rezeptor keinen Eintritt von HBV und HDV in den Hepatozyten zulässt (Yan et al. 2013), ist die Wildtyp-Maus resistent gegen eine HDV-Infektion. Eine Möglichkeit zur Umgehung dieser Problematik ist die Modifikation einiger Aminosäuren im murinen NTCP-Rezeptor (He et al. 2016, Luetgehetmann et al. 2018) oder Expression des humanen NTCP-Rezeptors in transgenen Mäusen (He et al. 2015) bei gleichzeitiger Expression der notwendigen HBV-Hüllproteine (Winer et al. 2018). Nachteile dieses Modells sind jedoch, dass bislang keine gleichzeitige HBV-Infektion etabliert werden konnte, die HDV-Infektion aufgrund vermutlich weiterer Spezies-spezifischer Mechanismen der murinen Hepatozyten nicht ausreichend toleriert wird und nur niedrige Infektionsraten sowie eine kurze Infektionsdauer etabliert werden können (Giersch et al. 2021b). In einem anderen Ansatz wird über die hydrodynamische Injektion von komplementärer HDV-DNA (HDV-cDNA), von in vitro transkribierter HDV-RNA (Chang et al. 2001) oder von HDV-kodierenden Plasmiden in die murine Schwanzvene HBV-transgener Mäuse (Bordier et al. 2003) eine HDV-Replikation generiert. Dieses Modell eignet sich aufgrund seiner Kurzlebigkeit besonders zur Charakterisierung der akuten Auswirkungen der HDV-Replikation (Dandri und Lütgehetmann 2014), ist jedoch gleichzeitig aufgrund der schnellen Injektion hoher Volumina mit gravierenden Leberschäden verbunden (Dandri und Petersen 2017). Weiterhin können Adeno-assoziierte Viren (AAV) als Vektor zur Einschleusung des HDV- und HBV-Genoms in immunkompetente Mäuse genutzt werden und in diesen eine produktive

„Koinfektion“ hervorrufen (Suárez-Amarán et al. 2017), was gut zur Untersuchung des HDV-Lebenszyklus und der HDV-induzierten Leberpathologie genutzt werden kann (Maestro et al. 2021). Das AAV-System eignet sich jedoch weder zur Erforschung des Virus-eintrittes und der antiviralen Therapie mit Entry-Inhibitoren, noch können immunvermittelte Spezies-assoziierte Unterschiede ergründet werden (Giersch und Dandri 2021).

Einige der bereits genannten Nachteile können mittels Einsatz sogenannter human-Leber-chimärer Mäuse vermieden werden, indem im Rahmen einer xenogenen Transplantation primäre humane Hepatozyten (PHH) in die murine Leber einer immundefizienten Maus integriert werden (Burwitz et al. 2020). Das in dieser Arbeit genutzte Mausmodell wird im Folgenden genauer dargestellt.

2.5.1 uPA/SCID/beige/*IL2RG*^{-/-}(USG)-Mausmodell

Das USG-Mausmodell mit human-Leber-chimären Mäusen (englisch: *human liver chimeric mice*) eignet sich besonders zur Analyse der HBV- und HDV-Interaktion mit humanen Hepatozyten beziehungsweise der viralen Dynamiken untereinander sowie zur präklinischen Testung antiviraler Substanzen in Abwesenheit einer adaptiven Immunantwort (Lütgehetmann et al. 2012). Es ist ein gut charakterisiertes Mausmodell und ist auch in der Forschung mit HCV (Meuleman et al. 2005) und dem Hepatitis-E-Virus (HEV) einsetzbar (Allweiss et al. 2016).

Die Überexpression des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA)-Transgens, gesteuert durch einen Albumin-Promotor, führt in Mäusen kurz nach ihrer Geburt zu einer frühen Plasminogen-induzierten Hepatotoxizität. Die Plasminogen-vermittelte Aktivierung von Plasmin, welches proteolytische Schäden im endoplasmatischen Retikulum hervorruft (Dandri et al. 2001, Sandgren et al. 1991), resultiert in einem Absterben der das Transgen-tragenden murinen Hepatozyten. Gleichzeitig wird das adaptive Immunsystem durch beispielsweise einen schweren kombinierten Immundefekt (englisch: *severe combined immunodeficiency syndrome*, SCID) und die sogenannte *beige*-Mutation, die zu einer Abwesenheit funktionierender B- und T-Lymphozyten sowie natürlicher Killerzellen führen (Bosma et al. 1983, Roder 1979), ausgeschaltet. Zusätzlich führt ein Knockout des *Interleukin-2 receptor gamma chain (IL2RG)*^{-/-}-Gens (Giersch et al. 2021c) zu einer Thymushypoplasie und einem allgemeinen Lymphozytenmangel (Cao et al. 1995). Folglich können kryokonservierte primäre humane Hepatozyten xenogen transplantiert werden und die murine Leber repopulieren (Dandri et al. 2001).

Nach ausreichender hepatischer Repopulation durch humane Hepatozyten, objektiviert anhand des humanen Albuminspiegels im Mausserum, wird die intraperitoneale HBV-Infektion

vorgenommen. Die HDV-Infektion kann dabei entweder gleichzeitig im Rahmen einer HBV/HDV-Koinfektion erfolgen, oder sie findet nach über acht Wochen als Superinfektion statt (Lütgehetmann et al. 2012). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass HDV auch in Abwesenheit von HBV für mindestens 6 Wochen persistieren und umgekehrt durch HBV-Superinfektion in eine produktive, replizierende Infektion übergehen kann (Giersch et al. 2014). Der genaue Ablauf der Etablierung einer HDV-Infektion in den USG-Mäusen kann Abbildung 9 entnommen werden.

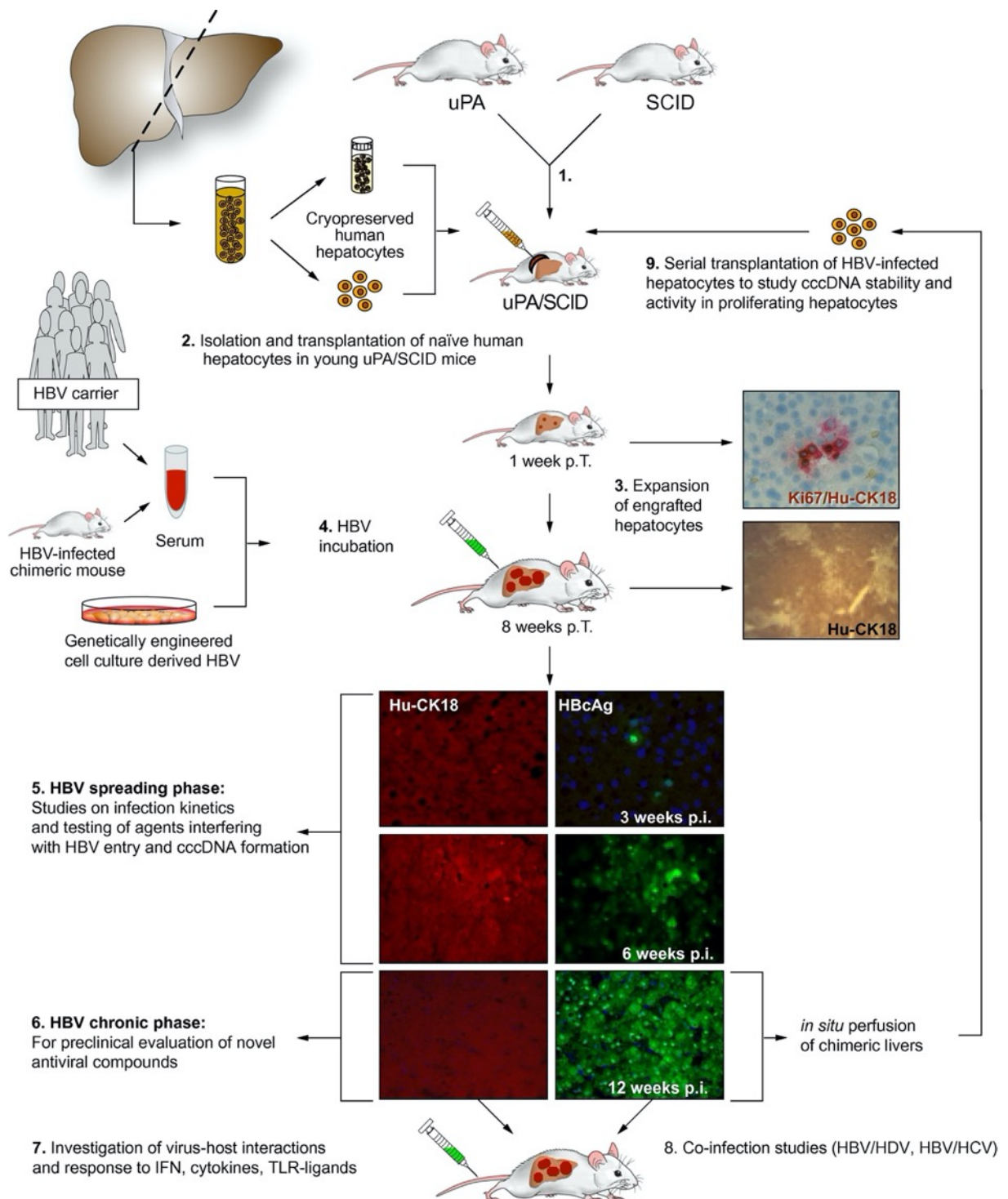


Abbildung 9: uPA-SCID-Mausmodell für die HBV- und HDV-Infektion

1) Generierung von uPA-SCID-Mäusen. 2) Transplantation von einer Million primären humanen Spenderhepatozyten in etwa 2 bis 3 Wochen alte homozygote uPA-SCID-Mäuse über die Milz. 3) Eine Woche nach Transplantation proliferieren erste Hepatozyten-Cluster in der Mausleber, dargestellt über humanspezifische Färbung von Cytokeratin 18 und ki67. 4) Intraperitoneale HBV-Infektion über HBV-infiziertes menschliches oder murines Serum oder über Zellkultur-generierte Viren. 5) Nach 6 Wochen HBV-Ausbreitung sind bereits die meisten Hepatozyten infiziert. 6) Nach 12 Wochen sind fast alle Hepatozyten infiziert. Im Setting dieser chronischen Infektion können zum Beispiel die Wirksamkeit antiviraler Substanzen und 7) das angeborene Immunsystem in humanen Hepatozyten in Abwesenheit einer adaptiven Immunantwort untersucht werden. 8) Chronisch beziehungsweise stabil HBV-infizierte Mäuse können mit HDV superinfiziert werden. 9) Transplantation bereits infizierter humaner Hepatozyten in die Mausleber zur Untersuchung von HBV-Parametern in proliferierenden Zellen (Dandri und Petersen 2012).

2.6 HDV-Zellkulturmodelle

Neben den bereits erläuterten Tiermodellen werden auch einige in vitro-Systeme für die HDV-Forschung verwendet. Diese bieten den Vorteil, dass ethische Bedenken größtenteils umgangen werden können und Experimente zum einen in kontrollierter physiologischer Umgebung stattfinden können und zum anderen, im Falle klonaler Zellen, leichter reproduzierbar sind (Arango et al. 2013). Gleichzeitig sind Zellkulturversuche trotz einer vergleichsweise geringen Zellzahl häufig kosten- und zeitintensiv (Arango et al. 2013) und Modelle, die den gesamten HBV- und HDV-Lebenszyklus ermöglichen, sind nur begrenzt verfügbar (Heuschkel et al. 2021, Lee et al. 2023). Im Rahmen einer HDV-Infektion kommen aktuell vorrangig primäre humane Hepatozyten oder hepatische Tumorzellen zum Einsatz.

2.6.1 Tumorzelllinien

Aus dem Tumor einer HCV-infizierten Leber generierte HepaRG-Zellen werden bereits seit einigen Jahren zur HBV- und HDV-Kultur eingesetzt (Engelke et al. 2006, Gripon et al. 2002). Bei HepaRG-Zellen handelt es sich um Vorläuferzellen, welche die Fähigkeit besitzen, sich in vitro in Gallengangs- und Hepatozyten-ähnliche Zellen zu differenzieren (Marion et al. 2010) und so neben einigen hepatischen Enzymen und Transkriptionsfaktoren

auch NTCP exprimieren können (Ni et al. 2014). Im differenzierten Zustand kann in HepaRG-Zellen eine starke HDV-induzierte Interferon-Antwort ausgelöst werden (Alfaiate et al. 2016). Aufgrund der andererseits eher niedrigen HBV-Infektionsraten von HepaRG-Zellen und nur schwach vorhandener cccDNA-Amplifikation sowie sehr eingeschränkter Virus-Ausbreitung auf uninfizierte Zellen (Hantz et al. 2009) ist ihr Einsatz jedoch limitiert. Andere Tumorzelllinien, wie die aus einem hepatozellulären Karzinom stammenden Huh7- und HepG2-Zellen, sind leicht zu handhabende Zellkulturmodelle und werden seit Jahrzehnten für die HDV-Forschung genutzt (Guo et al. 2023). Da ihnen jedoch einige Funktionen wie die NTCP-Expression fehlen, sind diese nicht zur Untersuchung des gesamten HDV-Lebenszyklus geeignet (Guo et al. 2023). Dies kann in Teilen durch die Entwicklung NTCP-tragender Tumorzellen (Huh7-NTCP, HepG2-NTCP) umgangen werden (Ni et al. 2014). Um die späten Schritte im HDV-Lebenszyklus zu erleichtern, ist zudem eine NTCP- und HBsAg-exprimierende HepG2-Zelllinie (HepNB2.7) entwickelt worden (Lempp et al. 2019). Weiterhin wurden HDV-RNA und HBsAg exprimierende Huh7-2C8D (Bach et al. 2023) und Huh7-END-Zellen (Ni et al. 2019) geschaffen, die zu einer schnellen und effizienten Produktion infektiöser HDV-Viren genutzt werden können. Die Ko-Kultivierung einiger Tumorzellen mit beispielsweise natürlichen Killerzellen konnte zudem Informationen zum Verständnis der Immunreaktion bei HDV-Infektion beitragen (Groth et al. 2023).

Im direkten Vergleich sind Huh7-NTCP-Zellen zwar leichter für eine HDV-Infektion zugänglich als HepG2-NTCP- und HepaRG-Zellen, scheinen jedoch keine vollständige angeborene Immunantwort zu leisten und die Infektion mit HBV nicht ausreichend zu begünstigen (Bach et al. 2023, Ni et al. 2014, Zhang et al. 2018).

2.6.2 Primäre humane Hepatozyten (PHH)

Die ersten HDV-Zellkulturen mit primären Hepatozyten fanden bereits in den 1980er-Jahren mit Zellen des Walddarmtellers (Taylor et al. 1987) und des Schimpansen (Sureau et al. 1991) statt, gefolgt von PHHs in den 2000er-Jahren (Gudima et al. 2007). PHHs dienen als natürlicher Wirt für HBV und HDV und ermöglichen den vollständigen Lebenszyklus dieser Viren (Heuschkel et al. 2021), sodass sie insbesondere zur Untersuchung antiviraler Substanzen und der Interaktion zwischen Virus und Wirt (also Hepatozyt) genutzt werden (Guo et al. 2023).

Allerdings sind hochqualitative PHHs nur begrenzt verfügbar und aufgrund variabler Qualität und Herkunft der Spenderhepatozyten (Bhagal et al. 2011) kommt es zu schwankenden Effizienzen in Bezug auf die HBV- und HDV-Infektion (Guo et al. 2023). Entgegen der sonst hohen Regenerationsfähigkeit der Leber bleibt eine Proliferation der Hepatozyten in vitro

aus und die Handhabung gestaltet sich allgemein anspruchsvoll (Guo et al. 2023). Außerdem tritt nach Isolierung der PHHs meist rasch aufgrund von Ischämie, gestörter Gewebsarchitektur und Anpassung an die Umgebung eine veränderte leberspezifische Genexpression auf, die zu einer sogenannten Dedifferenzierung der Hepatozyten führt und morphologische Anpassungen sowie den Verlust einiger Eigenschaften wie die normalerweise stark vorhandene Polarität der Hepatozyten nach sich zieht (Elaut et al. 2006). Dies verringert die Disposition der Hepatozyten für die Infektion mit HBV und HDV (Guo et al. 2023). Die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) und weiteren Chemikalien wie Forskolin, ein Aktivator der Adenylatzyklase, in das Kulturmedium kann den Prozess der Dedifferenzierung verlangsamen und HBV-Infektionsraten sowie Replikation steigern (Elaut et al. 2006, Gripon et al. 1988, Xiang et al. 2019), genauso wie die Ko-Kultivierung von PHHs mit nicht-parenchymatösen Leberzellen (Winer et al. 2020). Andere moderne Verfahren wie 3D-Kulturen (Ortega-Prieto et al. 2018) oder PHH- (De Crignis et al. 2021) beziehungsweise Stammzell-generierte (Nie et al. 2018) Leberorganoide wurden bislang lediglich für die HBV-Infektion erprobt, konnten jedoch ebenfalls eine frühzeitige Dedifferenzierung von Hepatozyten verhindern.

Derzeit gelten PHHs aufgrund der im Vergleich zu anderen Zelllinien weitgehend erhaltenen physiologischen Funktionen wie einer Hepatozyten-vermittelten Immunantwort und des Lebermetabolismus jedoch weiterhin als Goldstandard des hepatischen Zellkulturmodells und für die Untersuchung von HBV und HDV sowie der angeborenen Immunreaktion im Rahmen der Virusinfektion in Zellkultur (Guo et al. 2023, Heuschkel et al. 2021).

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller	Land
Abbott Architect Platform	Abbott Laboratories, Abbott Diagnostics	USA
ABI ViiA Real-Time PCR System	Applied Biosystems	USA
Autoklav VX-120	Systec	Deutschland
Centrifuge 5427R	Eppendorf SE	Deutschland
Centrifuge 5810R	Eppendorf SE	Deutschland
CO2-Inkubator mit Heißluftsterilisation Modell CB-S 170	BINDER GmbH	Deutschland
cobas® 6800 System	Roche	Schweiz
Cryostar NX50 Kryostat	ThermoFisher	
ELISA	Bethyl Laboratories, Biomol GmbH	Deutschland
Eppendorf ThermoMixer® C	Eppendorf SE	Deutschland
EUROStar Fluoreszenzmikroskop	Euroimmun AG	Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop BZX710	Keyence	Japan
GeneAmp® PCR System 9700 thermal	Applied Biosystems	USA
Graph Pad Prism 10 for macOS Software	GraphPad	USA
Leica DM IL LED Inverses Labormikroskop	Leica Microsystems GmbH	Deutschland
Microsoft® PowerPoint	Microsoft	USA
Multipette® stream	Eppendorf SE	Deutschland
MyFuge™ 12 Mini Centrifuge C1012	Benchmark Scientific Inc.	USA
NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer	Thermo Scientific	USA
neoLab Vortex Mixer 7-2020	neoLab	Deutschland
Pipetten Research Plus (10/ 20/ 100/ 200/ 1000 µl)	Eppendorf SE	Deutschland
Qubit® Fluorometer 3.0	Thermo Fisher	USA
Universalwasserbad Precision GP 05	Thermo Fisher	USA

3.1.2 Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Land
Zellkulturschalen NUNC™ Multidish 12 und NUNC™ Multidish 24	Thermo Fisher	USA
Biosphere® Filter Tips (20, 100, 200, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co.	Deutschland
Biosphere® plus SafeSeal Tube 1.5 ml	Sarstedt AG & Co.	Deutschland
X-Well Zellkulturkammer, 4 Well und 8 Well auf Glasobjektträger	Sarstedt AG & Co.	Deutschland
Combitips Advanced®	Eppendorf SE	Deutschland
High Precision Deckgläser (24 x 50 mm und 24 x 60 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Deutschland
Eppendorf Tubes® (1.5 ml, 2 ml)	Eppendorf SE	Deutschland
Schraubröhre 15 ml und 50 ml	Sarstedt AG & Co.	Deutschland
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 ml)	Applied Biosystems	USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems	USA
Mikropistill Standard für 1.5 ml	Carl Roth GmbH	Deutschland
Multiply®-µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt AG & Co.	Deutschland
C-Chip Neubauer Einweg-Zählkammer	NanoEntek	Korea / USA
Nunc™ 24-Well Platte	Thermo Fisher	USA
SuperFrost™ Plus Objektträger 25 x 75 x 1,0 mm	R. Langenbrinck GmbH	Deutschland
Petrischalen	Sarstedt AG & Co.	Deutschland
Pinzette Fine Forceps	Fine Science Tool	Deutschland

3.1.3 Tabelle 3: Biomaterial

Biomaterial	Hersteller / Lieferant	Ort
USG-Mäuse	FTH Hamburg	Hamburg, Deutschland
Primäre humane Hepatozyten (Lot HU8130)	Gibco / Thermo Fisher	USA
Virus HDV-1cc (Zugriffsnummer: AJ00058)	bereitgestellt von Dr. John Taylor	Philadelphia, USA
Virus HDV-1p (Zugriffsnummer OL825606)	bereitgestellt von Prof. Dieter Glebe	Gießen, Deutschland

3.1.4 Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller	Land
2-Methylbutan	Carl Roth GmbH	Deutschland
ABI Fast 1-Step Virus Master	Applied Biosystems	USA
ABI Fast Advanced Master	Applied Biosystems	USA
Aceton z. A., ACS, Reag. Ph. Eur., Reag. BP, Reag. USP	Chemosolute / TH Geyer	Deutschland
Bovine Serum Albumin Protease Free	GE Healthcare	USA
Collagen R 0,2 % Lösung steril	Serva	Deutschland
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako	Dänemark
Dimethylsulfoxid (DMSO) HybriMax™	Sigma-Aldrich	USA
Gentamicin 5 mg/ml	Gibco / Thermo Fisher	USA
GlutaMax™	Gibco / Thermo Fisher	USA
HepatoZYME wash	Gibco / Thermo Fisher	USA
HepatoZYME-SFM	Gibco / Thermo Fisher	USA
HyClone™ FetalClone™ II-Serum	Cytiva	USA
Hydrocortison	Sigma-Aldrich	USA
Insuman Rapid 100 I.E./ml	Sanofi	Deutschland
L-Glutamin 200mM	Gibco / Thermo Fisher	USA
Paraformaldehyd-Lösung, 4 % in PBS, Thermo Scientific Chemicals	Thermo Fisher	USA
Penicillin / Streptomycin	Gibco / Thermo Fisher	USA
Polyethylen glycol	Sigma-Aldrich	USA
Prospec HBV Pre-S 500 µg (Katalognummer: HBV-231)	Prospec	Israel
RNeasy Lysis Buffer (Buffer RLT)	Qiagen	Niederlande
Roferon® Interferon alfa-2a	Roche	Schweiz
Triton X-100	Sigma-Aldrich	USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich	USA
Wasserstoffperoxid 30 %	Sigma-Aldrich	USA
William's E Medium	Thermo Fisher	USA

3.1.5 Tabelle 5: Pufferlösungen

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller	Land
TNB-Puffer (Tris-NaCl-blocking buffer) pH 7,5	0,15M NaCl	Sigma-Aldrich	USA
	0,1M Tris	Sigma-Aldrich	USA
	0,5 % TSA Blocking reagent	PerkinElmer	USA
	+ Vollentsalztes Wasser		
TN-Puffer (Tris-HCl, NaCl) pH 7,5	0,15M NaCl	Sigma-Aldrich	USA
	0,1M Tris	Sigma-Aldrich	USA
	+ Vollentsalztes Wasser		
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) pH 7,4	1,06 mM Kaliumdihydrogenphosphat 155 mM NaCl 2,97 mM Natriumphosphat, dibasisch	Gibco / Thermo Fisher	USA

3.1.6 Tabelle 6: Kits

Kit	Hersteller	Land
Architect HBeAg Assay	Abbott Ireland Diagnostics	Irland
Architect HBsAg Assay	Abbott Ireland Diagnostics	Irland
Human Albumin ELISA Kit	Immunology Consultants Laboratory	USA
MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit	Epicentre	USA
QIAamp MinElute Virus Spin Kit	Qiagen	Niederlande
Qubit® dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen	Germany
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Niederlande
Taqman Gene Expression Assays	Applied Biosystems	USA
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche	Schweiz
TSA®-Fluorescein-Kit	Perkin Elmer	USA

3.1.7 Tabelle 7: Antikörper zur Immunfluoreszenzfärbung

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Land
Hoechst 33258	1:20 000	Invitrogen	Deutschland
Anti-HDAg (Mensch)	1:8 000	anti-HDAg-positives humanes Serum aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf	Deutschland
Anti-HLA-A-B-C (ABIN 100533, Maus)	1:50	antikoerper-online.de (Rockland Immunochemicals)	Irland
Anti-HBcAg (Kaninchen)	1:2 000	Dako	Dänemark
Alexa Fluor® 555 Ziege anti-Mensch	1:1 200	Invitrogen	Deutschland
Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Maus	1:400	Invitrogen	Deutschland
Peroxidase-konjugiertes AffiniPure™ Ziege anti-Kaninchen IgG	1:200	Jackson ImmunoResearch Laboratories	UK

3.1.8 Tabellen 8 und 9: Primer und Sonden

Die Primer und Sonden für die HDV-Messungen wurden aus einer Publikation von Ferns et al. (Ferns et al. 2012) übernommen und erkennen alle HDV-Genotypen. Die Primer und Sonden zur Messung der HBV-pgRNA stammen aus der Publikation von Malmström et al. (Malmström et al. 2012).

Messung	Primer / Sonde	Sequenz 5' → 3'
HDV-RNA	Forward Primer	GCG CCG GCY GGG CAA C
	Reverse Primer	TTC CTC TTC GGG TCG GCA TG
	Sonde	FAM-CGC GGT CCG ACC TGG GCA TCC G-BHQ
HBV-pgRNA	Forward Primer	GGT CCC CTA GAA GAA GAA CTC CCT
	Reverse Primer	CAT TGA GAT TCC CGA GAT TGA GAT
	Sonde	TCT CAA TCG CCG CGT CGC AGA

Für alle übrigen quantitativen PCR-Messungen wurden TaqMan-Genexpressionsassays genutzt, welche entsprechende humanspezifische Primer und Sonden beinhalten. Sie wurden zusammen mit dem ABI Fast Advanced Master (Applied Biosystems, USA) angewandt.

Gen	Assay Nummer (Applied Biosystems, USA)
HBV-DNA	Pa03453406_s1
GAPDH	Hs99999905_m1
RPL30	Hs00265497_m1
Stat1	Hs01013989_m1
ISG15	Hs00192713_m1
Mx1	Hs00895608_m1
CXCL10	Hs00171042_m1
NTCP	Hs00914889_m1
Humanes beta-Globin	Hs00758889_s1
Murines beta-Actin	Mm00607939_s1

3.2 Methoden

3.2.1 Generierung und Infektion humanisierter USG-Mäuse

Die sogenannten *human liver chimeric urokinase-type plasminogen activator (uPA)/severe combined immunodeficiency (SCID)/ beige/ Interleukin-2 receptor gamma chain knockout (IL2RG^{-/-})*-Mäuse, kurz USG-Mäuse, beruhen auf dem im Einleitungsteil (siehe Abschnitt 1.5.1) bereits ausführlich erläuterten Tiermodell zur Erforschung der Hepatitisviren (Lütgehetmann et al. 2012). Zur Humanisierung der USG-Mäuse wurden jeweils eine Million primäre humane Spenderhepatozyten (Spender Hu8130, Thermo Fisher Scientific, USA), welche zuvor kryokonserviert gelagert waren, über die Milz in eine USG-Maus transplantiert. Zur Erfolgskontrolle der murinen hepatischen Repopulation durch humane Hepatozyten fand mittels eines ELISA (Bethyl Laboratories, Biomol GmbH, Deutschland) eine Messung des Albumins statt, welches als human- und leberspezifisches Protein als Marker für das erfolgreiche Wachstum der humanen Hepatozyten dient (Roll und Willenbring 2010). Für diese Arbeit wurden Mäuse mit Albuminspiegeln von über 13 mg/ml im Serum verwendet. Nach 10 Wochen erfolgte die Infektion über eine peritoneale Injektion von entweder 2 µl eines HBV-monoinfizierten Inokulums (Endserum einer chronisch HBV-infizierten Maus, entspricht 3×10^7 Kopien HBV-DNA vom Genotyp D) oder 50 µl eines HBV/HDV-1p-koinfizierten Inokulums (Endserum einer chronisch HBV/HDV-1p-infizierten Maus, entspricht 1×10^6 Kopien HBV-DNA, 2×10^6 Kopien HDV-RNA). Zur Erfolgskontrolle der Infektion fand eine regelmäßige Messung der Viruslast (HBV-DNA, HDV-RNA) im Serum statt. Die HBV/HDV-1p-koinfizierte Maus wurde nach knapp 10 Wochen zur Isolation der Hepatozyten sakrifiziert, die HBV-mono-infizierte Maus nach 15 Wochen.

Die Haltung der Mäuse erfolgte unter speziellen, keimfreien Konditionen. Alle Versuche wurden gemäß der Richtlinie des Rates der Europäischen Gemeinschaften zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (2010/63/EU) sowie der Deklaration von Helsinki durchgeführt und zuvor von der Stadt Hamburg, Deutschland, genehmigt (Tierversuchsantrag Nummer N090/20 vom 01.12.2020).

3.2.2 Zellisolation aus stabil infizierten humanisierten Mäusen

Zur Isolation der Hepatozyten wurden zwei verschiedene Mäuse ausgewählt. Die HBV/HDV-1p-koinfizierte Maus hatte eine Viruslast im Endserum in Höhe von $2,5 \times 10^9$ HBV-DNA-Kopien pro ml und $1,5 \times 10^7$ HDV-RNA-Kopien pro ml. Die HBV-monoinfizierte Maus hatte 7×10^9 Kopien HBV-DNA im Endserum.

Ungefähr 30 Minuten vor Isolation der Hepatozyten wurden der noch lebenden Maus zur verbesserten Leberperfusion und erleichterten Zellisolation 100 µl Heparin subkutan verabreicht. Die Tötung der Maus erfolgte mit Isofluran. Danach wurden Abdomen und Thorax der Maus steril eröffnet und die Leber freigelegt. Der Lobus caudatus wurde zur späteren Immunfluoreszenzfärbung abgetrennt und bei -80°C konserviert. Über eine Punktion des rechten Vorhofes wurde ein Schlauch über die Vena cava inferior bis kurz vor die Leber vorgeschoben und über einen Faden fixiert. Die Vena cava inferior wurde unterhalb der Leber mit einer Klemme verschlossen und die Pfortader zum besseren Abfluss durchtrennt und die Galle über eine Inzision der Gallenblase drainiert. Über den Schlauch erfolgte nun für etwa 5 Minuten die Spülung mit einer Präperfusionslösung, bestehend aus dem Protease-Inhibitor EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, zur Auflockerung der Tight Junctions), dem sogenannten Lefferts-Puffer (bestehend aus HEPES-Pufferlösung, Kaliumchlorid, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat und D-Glukose) und Wasser. Danach wurde die auf 39°C vorgewärmte Digestionslösung (Calciumchlorid, Lefferts-Puffer, Wasser und Kollagenase; pH-Wert 7,4) für 30 Minuten über eine Pumpe mit einer Geschwindigkeit von 5 bis 6 ml pro Minute bis zu einem Gesamtvolumen von 150 ml in die Leber appliziert. Die Digestionslösung bewirkt eine Zersetzung des Kollagens in der Extrazellulärmatrix, sodass die primären humanen Hepatozyten freier wurden.

Die Leber wurde am Ende des Digestionsvorganges schließlich aus der Maus entfernt. Durch vorsichtiges Ausstreichen der Leberkapsel konnten die freigesetzten Hepatozyten in einem Hepatozytenwaschmedium (HepatoZYME Wash, Gibco™, USA) aufgefangen werden. Durch mehrmaliges Sieben und Zentrifugieren entstand ein Hepatozyten-Pellet, welches durch Schwenken und Klopfen gelöst und mit 30 ml Waschmedium vermengt wurde. Nach mehrmaliger Zentrifugation erfolgte eine Vitalitätsbestimmung, indem 10 µl der gelösten Hepatozyten mit 10 µl Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer vitale Zellen manuell ausgezählt wurden. Dabei zeigten sich 16 Millionen (HBV/HDV-1p-Koinfektion) beziehungsweise 17 Millionen (HBV-Monoinfektion) vitale Zellen. Nach insgesamt vier Zentrifugationen wurde das Zell-Pellet in HepatoZYME-SFM (Gibco™, USA) gelöst. Es folgte die rasche Ausplattierung der Zellen (siehe Abschnitt 2.2.3).

3.2.3 Zellkultur

Alle drei Szenarien der HDV-Infektion wurden unter Verwendung von PHHs durchgeführt und jeweils hinsichtlich der Ansprechraten auf IFNα in vitro geprüft. Für die Koinfektion wurden in vivo HBV/HDV-1p-infizierte PHHs aus einer chronisch infizierten USG-Maus genutzt, für die Superinfektion wurden HBV-infizierte PHHs isoliert und in vitro mit HDV-1p infiziert.

Für die HDV-Monoinfektion wurden kryokonservierte PHHs in vitro mit HDV-1p oder HDV-1cc infiziert.

Die Beschichtung aller für die Zellkultur genutzten Platten und Kammerobjektträger erfolgte vorab mit Kollagen R im Verhältnis 1:10. Dieses wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetragen. Anschließend wurden die Platten mit phosphathaltiger Pufferlösung (PBS) gewaschen und für 30 Minuten bei 37°C getrocknet. Die Lagerung bis zur Ausplattierung der PHHs erfolgte unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur.

3.2.3.1 PHHs aus humanisierten Mäusen

In vivo infizierte PHHs wurden entweder aus einer chronisch beziehungsweise stabil HBV-infizierten Maus isoliert und in vitro mit HDV-1p superinfiziert oder aus einer bereits HBV/HDV-1p-koinfizierten Maus gewonnen. Im Anschluss wurden die Zellen mit IFN α behandelt und mit unbehandelten Kontrollen verglichen. Das Kulturmedium bestand aus 500 ml William's E Medium (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) unter Zugabe von 10 % HyClone™ FetalClone™ II-Serum (Cytiva, USA), 1 % GlutaMax™ (Gibco, USA), 0,1 µg/ml Insulin (Sanofi, Deutschland), 4,7 µg/ml Hydrocortison (Sigma-Aldrich, USA), und 1,8 % DMSO (Sigma-Aldrich, USA) genutzt. Zur Prophylaxe einer Kontaminierung erfolgte eine antibiotische Behandlung mittels Gentamicin, Penicillin und Streptomycin (Gibco, USA). Die Inkubation der Zellen fand im Brutschrank bei 37°C statt.

Für die HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs wurden Triplikate zu den Bedingungen 7 Tage IFN α , 7 Tage Kontrolle, 14 Tage IFN α und 14 Tage Kontrolle gebildet. Zur Messung von viralen Parametern und ISGs wurden je eine Million Zellen pro Well auf einer 12-Well-Platte sowie zur späteren Immunfluoreszenzfärbung und Fotografie je 200.000 Zellen pro Well in Kammerobjektträgern ausplattiert. Die HBV-monoinfizierten PHHs wurden zu 500.000 Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Ein Teil der HBV-monoinfizierten PHHs wurde 24 Stunden nach Ausplattieren mit HDV-1p superinfiziert, indem eine Infektionslösung, bestehend aus Kulturmedium, 30 % Polyethylenglykol (PEG) und HDV-1p-Inokulum mit einer Multiplizität der Infektion (engl. multiplicity of infection, MOI) von 1 (freundlicherweise produziert und bereitgestellt von Prof. Glebe, Universität Gießen, Deutschland), in die entsprechenden Wells gegeben und für 24 Stunden inkubiert. Als Zeitpunkt Baseline wurde der 10. Tag nach Superinfektion der Zellen festgelegt und die Hepatozyten ab dann für 7 oder 14 Tage mit IFN α behandelt oder als unbehandelte Kontrollen mitgeführt. Ein Teil der Zellen wurde außerdem als HBV-monoinfizierte Kontrollen mitgeführt und teilweise für 14 Tage mit IFN α behandelt.

Der Mediumwechsel erfolgte erstmalig vier Stunden nach dem Ausplattieren und im Verlauf zweimal wöchentlich mit einem Abstand von 3 bis 4 Tagen. Hierfür wurde das neue Medium vorab auf 37°C erwärmt. Der Überstand wurde zur späteren Analyse bei -80°C gelagert. In regelmäßigen Abständen wurde eine Mikroskopieaufnahme zur Beurteilung der noch erhaltenen Zellzahl angefertigt. Die Behandlung mit IFN α erfolgte durch Zugabe von 1000 U/ml Roferon® Interferon alfa-2a (Roche, Schweiz) in das Zellkulturmedium.

Zum Zeitpunkt Baseline oder am Ende des Behandlungszeitraumes nach 7 beziehungsweise 14 Tagen wurden die Zellen mit 400 μ l RNeasy Lysis Buffer (RLT-Buffer, Qiagen, Niederlande) beschichtet und mittels einer Pipette von der Zellkulturplatte entfernt. Bis zur späteren Analyse erfolgte die Lagerung bei -80°C. Die Kammerobjektträger wurden dreimal mit phosphathaltiger Pufferlösung (PBS) gewaschen und dann durch Zugabe von je 500 μ l Paraformaldehyd für 10 Minuten fixiert. Danach erfolgte die histologische Immunfluoreszenzfärbung (siehe Abschnitt 2.2.4).

3.2.3.2 *Kryokonservierte PHHs*

Zur Etablierung einer HDV-Monoinfektion in vitro wurden kryokonservierte primäre humane Hepatozyten (Spender ID HU8130, Gibco, USA) vorsichtig im Wasserbad bei 37°C in 500 ml Hepatocyte Wash Medium (Gibco, USA) unter Zugabe von HyClone™ FetalClone™ II-Serum (Cytiva, USA) aufgetaut. Eine manuelle Zählung der vitalen Hepatozyten erfolgte manuell mittels Neubauerzählkammer mit Trypanblau und ergab eine Vitalität von 76 % (7,2 Mio vitale Zellen). Nach einer Zentrifugation (50 g bei 4°C für 5 Minuten) wurde der Überstand abgekippt, das Zellpellet in 9 ml Medium verdünnt und unter vorsichtigem Schwenken langsam aufgelöst. In einer 24-Well-Platte wurden insgesamt 18 Wells à 400.000 Zellen pro Well befüllt. Das DMSO-freie Medium zum Ausplattieren bestand aus 500 ml William's E Medium (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) unter Zugabe von 10 % HyClone™ FetalClone™ II-Serum (Cytiva, USA), 1 % GlutaMax™ (Gibco, USA), 0,1 μ g/ml Insulin (Sanofi, Deutschland), 4,7 μ g/ml Hydrocortison (Sigma-Aldrich, USA) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, USA) genutzt. Nach 5 Stunden wurde das Anheften der Hepatozyten mittels Lichtmikroskopie bestätigt und der erste Mediumwechsel unter Zugabe von 1 % DMSO (HybriMax™, Sigma-Aldrich) durchgeführt. Der DMSO-Gehalt des Kulturmediums wurde danach auf 1,8 % angehoben. Nach 24 Stunden erfolgte die HDV-Infektion der Zellen, indem ein FCS-freies Kulturmedium um 4 % PEG angereichert und das HDV-1p- beziehungsweise HDV-1cc-Inokulum (MOI von 10) direkt ergänzt wurde. Das HDV-1-cc-Inokulum wurde freundlicherweise bereitgestellt von Dr. John Taylor (Pennsylvania, USA). Nach 24 Stunden wurden der Überstand abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und neues

Kulturmedium appliziert. Der Mediumwechsel erfolgte danach alle 3 bis 4 Tage. Als Zeitpunkt Baseline wurde der 6. Tag nach Infektion festgelegt. Ab diesem Tag wurden die Zellen für weitere 10 Tage kultiviert und 1000 U/ml Roferon® Interferon alfa-2a (Roche, Schweiz) durch Zugabe in das Kulturmedium behandelt.

3.2.4 Immunfluoreszenzfärbung

3.2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung von Kammerobjektträgern

Die Färbung der HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs erfolgte am Ende des Behandlungszeitraumes nach 7 beziehungsweise 14 Tagen mit dem TSA®-Fluorescein-Kit (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Nach Fixierung der Zellen (siehe Abschnitt 2.2.3.1) wurde der beschichtete Kammerobjektträger dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde PBS mit 10 % Rinderalbumin und 0,1 % Triton X versetzt und auf die Kammerobjektträger gegeben. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Applikation der Primärantikörper (siehe Abschnitt 2.1.7): Anti-HDAg (anti-HDAg-positives Patientenserum) im Verhältnis 1:8.000 und Anti-HLA im Verhältnis 1:50, jeweils verdünnt in 500 µl mit 1 % Rinderalbumin und 0,1 % Triton X versetztem PBS. Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS und 0,1 % Triton X wurden die fluoreszierenden Sekundärantikörper zur Visualisierung spezifischer Signale appliziert und für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen. Zur alleinigen HDAg-Färbung erfolgte als Zwischenschritt noch eine Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA) mittels Fluorophore Tyramide in Amplifikationslösung (TSA®-Fluorescein-Kit, Perkin Elmer, Deutschland) im Verhältnis 1:50 für 5 Minuten bei Raumtemperatur, für die HDAg-/HLA-Kofärbung wurde dieser Schritt ausgelassen. Nach einem erneuten Waschschrift folgte die Kernfärbung mit Hoechst 33258 (Invitrogen, Deutschland) im Verhältnis 1:20.000 in PBS mit 0,1 % Triton X für 2 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Prävention des Austrocknens der Zellen erfolgte die Lagerung in PBS bei 4°C. Die Mikroskopie wurde mit dem Fluoreszenz-Mikroskop BZ8710 (Keyence, Osaka, Japan) unter Zuhilfenahme der Z-Stack-Funktion durchgeführt.

3.2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung der Leber

Zur Immunfluoreszenzfärbung des Lebergewebes der beiden für die Zellkultur verwendeten infizierten Mäuse wurde vor Zersetzung des Lebergewebes der Lobus caudatus abgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.2) und bei -80°C aufbewahrt. Dieser wurde in einem Kryostat-Mikrotom

in 12 µm-dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Es folgte die Fixierung mit Aceton für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Zum Waschen wurde ein TN-Puffer (bestehend aus 0,15M Kochsalz und 0,1M Tris unter Zugabe von Salzsäure bis zu einem pH-Wert von 7,5) genutzt. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität folgte eine 10-minütige Inkubation mit PBS und 0,01 % Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur. Zur Blockade unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde ein TNB-Puffer (Kochsalz, Tris und Blockingreagenz, pH-Wert 7,5) für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schnitt belassen. Anschließend erfolgte die Applikation der Primäantikörper: Anti-HDAg (anti-HDAg-positives humanes Serum) in einer Verdünnung von 1:8.000 sowie Anti-HBcAg (Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:2.000. Diese wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Erzeugung des fluoreszierenden Signals wurden Alexa Fluor® 555 Ziege anti-Mensch (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland, Verdünnung 1:1.200) sowie Peroxidase-conjugiertes AffiniPure™ Ziege anti-Kaninchen IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA, Verdünnung 1:200) für 45 Minuten in TN-Puffer aufgetragen. Für die anschließende TSA-Amplifikation wurde das TSA®-Fluorescein-Kit (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) verwendet. Dazu wurde Fluorophore Tyramide in Amplifikationslösung (Verhältnis 1:50) für 5 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33258 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland, Verhältnis 1:20.000, 2 Minuten bei Raumtemperatur). Zuletzt wurde der gefärbte Schnitt mit einem Fluoreszenz-Eindeckmedium (Dako Fluorescence Mounting Medium, Dako, Glostrup, Dänemark) besiegelt und bei -80°C gelagert. Die Mikroskopie wurde mit dem Fluoreszenz-Mikroskop BZ8710 (Keyence, Osaka, Japan) unter Verwendung der Z-Stack-Funktion durchgeführt.

3.2.5 Intra- und extrazelluläre DNA- und RNA-Isolation

Die Messung der extrazellulären DNA und RNA aus den Überständen der Zellkultur erfolgte mit dem QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Niederlande). Die zuvor bei -80°C gelagerten Überstände wurden zunächst langsam im Aluminiumblock auf Eis aufgetaut. Ohne weitere Modifikation der Herstellerinstruktionen fand anschließend die Aufreinigung der DNA und RNA aus 200 µl Überstand statt, welche dann in jeweils 25 µl destilliertem Wasser verdünnt und bei -80°C gelagert wurde. Für die Isolation der intrazellulären DNA und RNA erfolgte unmittelbar nach Beendigung des Behandlungszeitraumes die Lösung und Lagerung der Zellen in 400 µl RNeasy Lysis Buffer (RLT-Buffer, Qiagen, Niederlande) bei -80°C. Die Zellen wurden zunächst langsam im Aluminiumblock auf Eis aufgetaut. Die Isolierung von DNA und RNA erfolgte separat mit jeweils 200 µl dieser Lösung. Die intrazelluläre DNA-Gewinnung wurde mit dem MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (E-

picentre, Wisconsin, USA) vorgenommen und die aufbereitete DNA in 35 µl Wasser verdünnt und bei -80°C gelagert. Zur Extraktion der intrazellulären RNA wurde das Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Niederlande) verwendet und die gelöste RNA in 50 µl Wasser bei ebenfalls -80°C gelagert. Zur Kontrolle der Aufreinigungen wurde unmittelbar nach Isolation eine RNA-Messung mit dem NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer (Thermo Scientific™, USA) vorgenommen, eine DNA-Messung erfolgte nach Herstellerinstruktionen mit dem Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Germany) auf dem Qubit® Fluorometer 3.0 (Thermo Fisher, USA).

3.2.6 Messung humaner und muriner Marker

Zur Sicherstellung, dass es sich bei den isolierten Hepatozyten in der Zellkultur um humane und nicht um murine Hepatozyten handelt, erfolgte eine Messung verschiedener Spezies-spezifischer Moleküle. Hierfür wurde 1 µl der aufgereinigten DNA mit 5 µl des ABI Fast Advanced Master (Applied Biosystems, USA), 3,5 µl destilliertem Wasser und 0,5 µl eines entsprechenden Primer-/Sonden-Ansatzes vermengt. Zielparameter waren humanes beta-Globin (Taqman Gene Expression Assay Hs00758889_s1, Applied Biosystems, USA) und murines beta-Actin (Taqman Gene Expression Assay Mm00607939_s1, Applied Biosystems, USA). Humanes beta-Globin ist ein Gen, welches nur einmal pro Zelle existiert, weshalb hierdurch außerdem die Gesamtzellzahl ermittelt werden kann (Giersch et al. 2021c). Die Probe wurde für 20 Sekunden auf 95°C erhitzt. Es folgte eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) mit 40 Amplifikationszyklen bei 95°C für 3 Sekunden und 60°C für 30 Sekunden. Die Ergebnisse wurden in Kopien pro µl angegeben. Zudem erfolgte eine Darstellung der beta-Globin-Kopien sowohl in Relation zur bekannten Menge DNA in ng (Allweiss et al. 2018) als auch als absolute Anzahl der Kopien pro Well.

3.2.7 Messung viraler Parameter

3.2.7.1 HDV-RNA

Die Quantifizierung der intra- und extrazellulären HDV-RNA geschah mittels reverser Transkription und anschließender qPCR auf einem ABI ViiA7 (Applied Biosystems, USA). Zunächst erfolgte eine 10-minütige Denaturierung von 5 µl RNA bei 95°C mit anschließend sofortiger Abkühlung auf -20°C. Nach Zugabe HDV-spezifischer Sonde und Vorwärts- und Rückwärts-Primer (siehe Tabelle Primer/Sonden), ABI Fast 1-Step Virus Master (Applied

Biosystems, USA) und Wasser wurde die reverse Transkription bei 50°C für 5 Minuten initiiert. Die Probe wurde anschließend für 20 Sekunden auf 95°C erhitzt zur Deaktivierung der reversen Transkriptase. Die anschließend insgesamt 40 Amplifikationszyklen setzten sich aus jeweils 3 Sekunden bei 95°C und 30 Sekunden bei 60°C zusammen.

Zur genauen Quantifizierung der HDV-RNA wurde eine vorab etablierte Standardkurve, gebildet aus bekannten Mengen eines HDV-Plasmides, unter Nutzung von Primern und Sonden einer Publikation von Ferns et al. (Ferns et al. 2012) (siehe Abschnitt 2.1.8) verwendet. Außerdem wurde in zwei Negativkontrollen die RNA durch Wasser beziehungsweise ein HBV-Protein (Prospec HBV Pre-S, Prospec, Israel) ersetzt. Des Weiteren fand eine Quantifizierung der HDV-RNA im Überstand mithilfe des automatisierten cobas® 6800 Systems (Roche, Schweiz) nach Herstellerinstruktionen statt (Pflüger et al. 2021a).

3.2.7.2 HBV-Parameter

Die Quantifizierung der HBV-DNA erfolgte mittels qPCR auf einem ABI Viia 7 (Applied Biosystems, USA). 4,5 µl der aus Überstand gewonnen extrazellulären HBV-DNA beziehungsweise 1 µl der aus den Hepatozyten isolierten intrazellulären DNA wurden zusammen mit HBV-spezifischen Primern und Sonden (siehe Abschnitt 2.1.8, Taqman Gene Expression Assay Pa03453406_s1, Applied Biosystems, USA) und ABI Fast Advanced Master (Applied Biosystems, USA) für 20 Sekunden auf 95°C erhitzt. Anschließend folgten 40 Amplifikationszyklen bei 95°C für 3 Sekunden und 60°C für 30 Sekunden. Für die intrazelluläre HBV-cccDNA wurde der Ansatz inklusive 1 µl DNA zunächst für 10 Minuten auf 95°C erhitzt, gefolgt von 40 Amplifikationszyklen zu je 1 Minute bei 95°C und 1 Minute bei 65°C.

Die Messung der intrazellulären HBV-pgRNA erfolgte aus der aufgereinigten Gesamt-RNA mittels oben genannter Primer und Sonden aus der Publikation von Malmström et al. zusammen mit dem ABI Fast 1-Step Virus Master (Applied Biosystems, USA). Nach Einleitung der reversen Transkription bei 50°C für 5 Minuten mit anschließender Erhitzung auf 95°C für 20 Sekunden zur Deaktivierung des Enzyms folgten 40 Amplifikationszyklen mit 95°C für 3 Sekunden und 60°C für 30 Sekunden. Die intrazelluläre Menge von HBV-pgRNA wurde anhand der mithilfe von TaqMan Genexpressionsassays gemessenen Expression von GAPDH und RPL 30 (Hs99999905_m1 und Hs00265497_m1, Applied Biosystems, USA) normalisiert.

Die Messungen des HBsAg und HBeAg aus dem Zellkulturüberstand erfolgten mittels des Architect HBsAg Assay beziehungsweise Architect HBeAg Assay (Abbott Ireland Diagnostics, Irland) nach Herstellerinstruktionen. Die Ergebnisse wurden für das HBsAg in IU pro ml und für das HBeAg in im *Signal-to-cut-off* (S/CO)-Verhältnis angegeben.

3.2.8 Messung der Genexpression

Zur Messung verschiedener Gene wurde die aufgereinigte, in Wasser gelöste RNA inklusive der Messenger-RNA (mRNA) zunächst mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Schweiz) in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dafür wurden 12 µl jeder Probe mit einem Oligo(dT)-Primer für 10 Minuten bei 65°C denaturiert. In einem Folgeschritt wurden ein Reaktionspuffer, eine Reverse Transkriptase, ein RNase-Inhibitor und ein Nukleotid-Mix (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche, Schweiz) mit jeweils 7 µl der mit dem Primer denaturierten RNA hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 50°C für eine Stunde und eine anschließende Erhitzung auf 85°C für 10 Minuten zur Deaktivierung der Reversen Transkriptase. Die cDNA wurde anschließend in 20 µl Wasser verdünnt und bei - 80°C gelagert.

Zur Messung der verschiedenen Gene aus 1 µl aufgereinigter, in Wasser gelöster cDNA wurden der ABI Fast Advanced Master (Applied Biosystems, USA) sowie spezifische Primer und Sonden der Taqman-Genexpressionsassays (Applied Biosystems, USA) genutzt. Die qPCR bestand aus einer initialen Erhitzung auf 95°C für 20 Sekunden mit anschließend 40 Amplifikationszyklen bei jeweils 3 Sekunden 95°C und 30 Sekunden 60°C.

Neben verschiedenen klassischen ISGs (Mx1, ISG15, Stat1, CXCL10) wurde auch die NTCP-Expression gemessen. Die humanen Haushaltsgene (Synonym: Housekeeper-Gene) GAPDH und RPL30 wurden zur Normalisierung der Werte genutzt.

3.2.9 Graphische Darstellungen

Die graphischen Versuchsplanungen wurden mit Microsoft® PowerPoint für Mac (Version 16.66.1, Microsoft, USA) erstellt. Für die Darstellung der Ergebnisse diente die Software GraphPad Prism 10 (GraphPad, Boston, MA, USA). Größtenteils boten sich dabei die logarithmischen Darstellungen zur Basis 10 an, um die Unterschiede auch in sehr kleinen und sehr großen Zahlenbereichen besser voneinander abzugrenzen. Dabei wurden die Logarithmuswerte jeweils auf die erste Nachkommastelle gerundet. Außerdem wurde im Rahmen der ISG- und NTCP-Induktion auch der *fold change*, also Wachstumsfaktor der Zu- oder Abnahme der Veränderung im Vergleich zum Ausgangswert, beschrieben. Aufgrund der geringen Fallzahl (überwiegend n = 3) wurde bei allen Messungen der Median dargestellt und zur Berechnung der jeweiligen Veränderungen gewählt.

4. Ergebnisse

4.1 In vitro Interferonbehandlung von stabil HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs

Primäre humane Hepatozyten wurden aus einer stabil HBV/HDV-1p-koinfizierten humanisierten Maus isoliert und für 7 oder 14 Tage in vitro mit IFN α behandelt. Entsprechende Kontrollen wurden mitgeführt. Ein Teil der Ergebnisse dieses Versuches ist bereits in einer Arbeit von Giersch et al. publiziert worden (Giersch et al. 2023). Es handelt sich konkret um die Abbildung 6 dieser Publikation. In der Diskussion werden ergänzende Ergebnisse dieser Publikation in die Ergebnisinterpretation integriert.

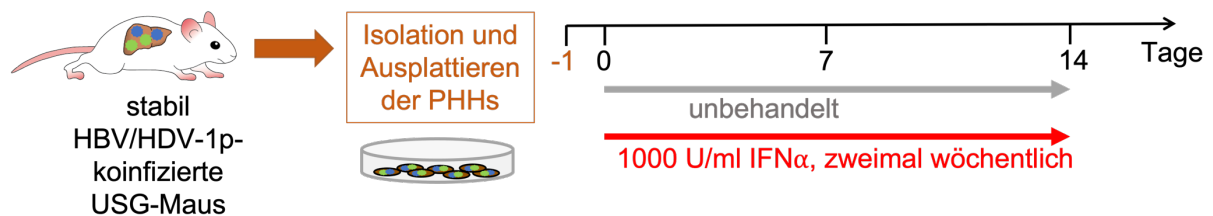


Abbildung 10: Versuchsaufbau mit HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs

10 Wochen nach einer HBV/HDV-1p-Koinfektion in einer humanisierten Maus erfolgte die Isolation stabil infizierter PHHs und Etablierung einer Zellkultur. 24 Stunden nach Ausplattierung begann eine Behandlung mit 1000 IU/ml IFN α für 7 oder 14 Tage. Entsprechende unbehandelte Kontrollen wurden mitgeführt.

Zum Zeitpunkt der PHH-Isolation war die Viruslast im murinen Serum bereits stabil und lag im Endserum bei $2,5 \times 10^9$ Kopien pro ml HBV-DNA und $1,5 \times 10^7$ Kopien pro ml HDV-RNA. Die Analyse des Lobus caudatus ergab pro humane Zelle eine intrazelluläre HBV-Menge in Höhe von 354 Kopien Gesamt-HBV-DNA und 0,9 Kopien HBV-cccDNA. Die auf die humanen Housekeeper-Gene GAPDH und RPL30 normalisierte Menge an HDV-RNA lag bei 9×10^{-2} . Die hepatische Repopulationsrate der murinen Leber durch humane Hepatozyten, berechnet auf Grundlage der Messwerte humane beta-Globins und murinen beta-Actins im Lebergewebe des Lobus caudatus, lag hier bei 17,98 %. In Abbildung 11 ist eine Immunfluoreszenzfärbung der Leber mit Darstellung der HBcAg- und HDAg-positiven Hepatozyten zu sehen.

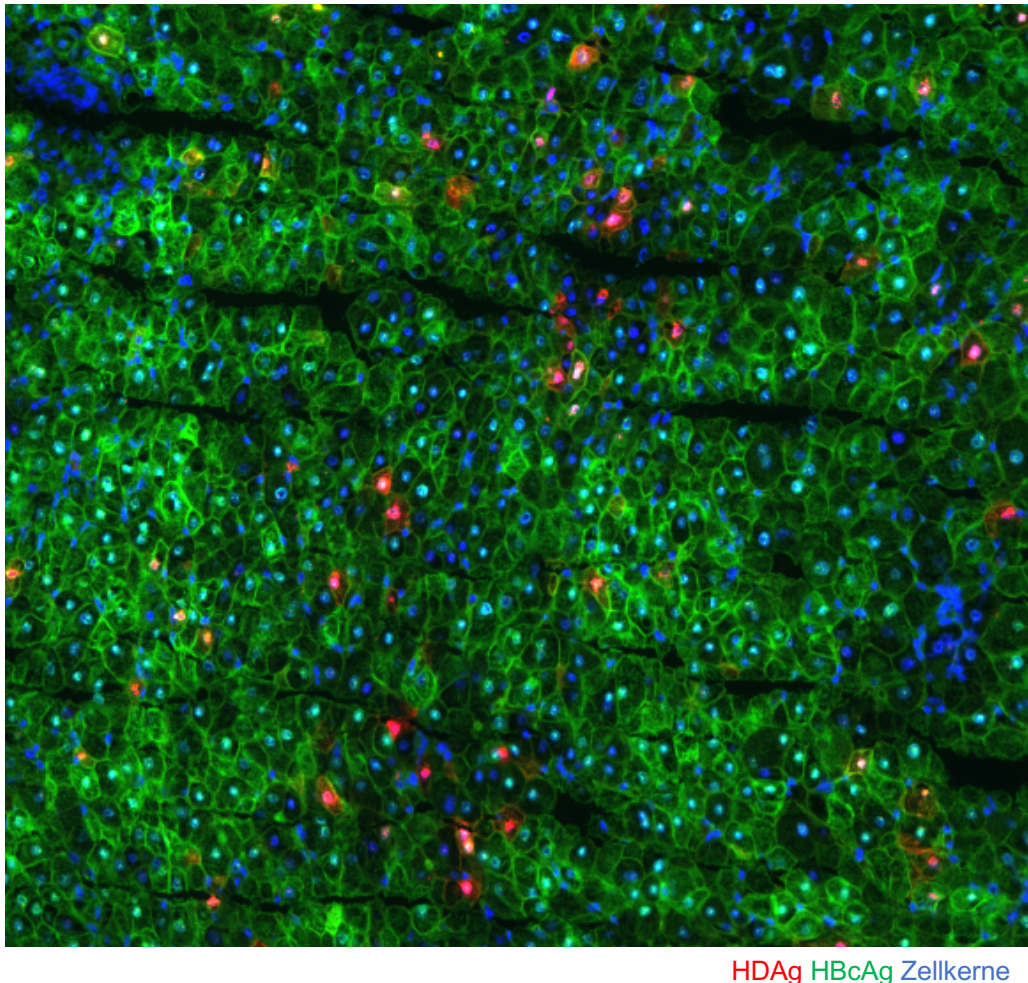


Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung der Leber bei HBV/HDV-1p-Koinfektion

Dargestellt sind das HDAg (rot), HBcAg (grün) und die humanen Zellkerne (blau) in 10-facher Vergrößerung. Das gefärbte Gewebe entspricht dem Lobus caudatus der HBV/HDV-1p-koinfizierten USG-Maus, welcher vor der Isolation der PHHs eingefroren wurde.

4.1.1 IFN α führt zu einer Reduktion der intra- und extrazellulären HDV-RNA und zu einer Abnahme der HDAg-positiven Hepatozyten

Die Menge an intrazellulärer HDV-RNA in Relation zu humanen Housekeeper-Genen in unbehandelten Kontrollen blieb während der gesamten Versuchsdauer konstant (Median nach 7 Tagen bei $n = 3$ $5,82 \times 10^3$ und nach 14 Tagen $4,55 \times 10^3$). Eine Behandlung mit IFN α hingegen führte zu einer deutlichen Reduktion sowohl der intra- als auch extrazellulären Viruslast. Nach 7 Tagen stellte sich eine Reduktion der intrazellulären HDV-RNA-Menge um 1,0-log und nach 14 Tagen um 1,6-log im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ein, was einer Abnahme von 89 % beziehungsweise 98 % entspricht (Abbildung 12A). Dies ließ sich auch anhand der Immunfluoreszenzfärbung des HDAg nach 7 und 14

Tagen verdeutlichen. Hier fand sich eine Reduktion der HDAg-positiven Zellen nach IFN α -Behandlung, wobei der Unterschied nach 14 Tagen deutlich stärker sichtbar wurde. Ein jeweils repräsentativer Bildausschnitt ergab für die Kontrollgruppen 11,6 % HDAg-positive Zellen nach 7 Tagen und 22 % nach 14 Tagen, wohingegen sich in den behandelten Zellen nur 4,7 % beziehungsweise 1,4 % HDAg-positive Zellen fanden (Abbildung 13).

Die Reduktion der Viruslast zeigte sich auch extrazellulär im Überstand (Abbildung 12B). Sowohl die herkömmlichen qPCR-Messungen (nicht abgebildet) als auch die Messung mittels cobas6800® (Roche, Schweiz) ergaben eine Reduktion der Menge an HDV-RNA um 0,1-log (25 %) nach 7 Tagen und um 0,7-log (81 %) nach 14 Tagen IFN α -Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

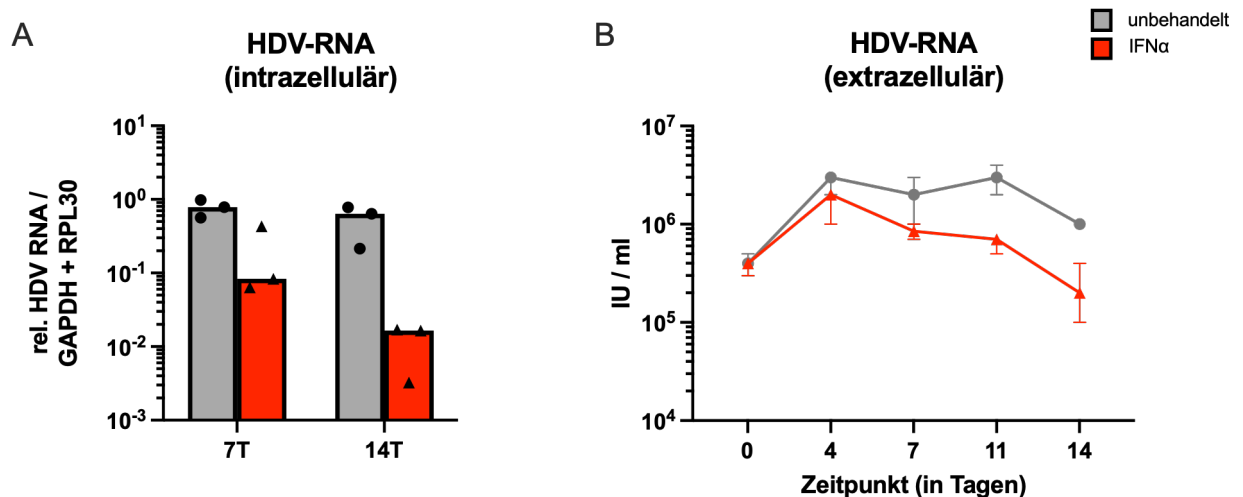


Abbildung 12: HDV-RNA nach IFN α -Behandlung in HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs

A) Intrazelluläre HDV-RNA in HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs, normalisiert auf die humanen Housekeeper-Gene GAPDH und RPL30 nach 7 und 14 Tagen Behandlung mit IFN α (rot) und in unbehandelten Kontrollen (grau). B) Extrazelluläre HDV-RNA in IU/ml im Zellkulturüberstand vor dem jeweiligen Mediumwechsel in IFN α -behandelten Zellen (rot) und unbehandelten Kontrollen (grau).

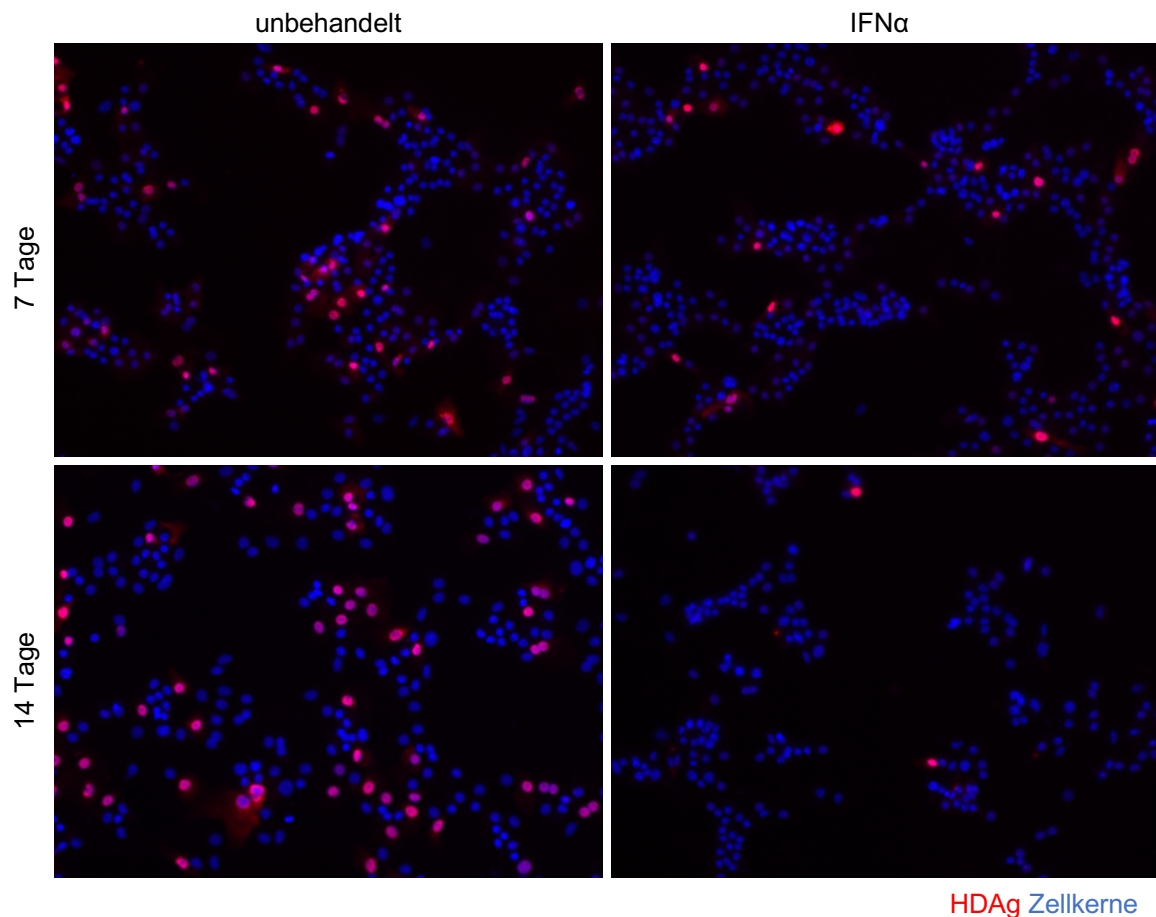


Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung des HDAg in HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs nach IFN α -Gabe

Dargestellt sind das HDAg (rot) und humane Zellkerne (blau) in koinfizierten PHHs nach 7 und 14 Tagen Behandlung mit IFN α im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Kontrollen. Nach 7 Tagen sind 11,6 % und nach 14 Tagen 22 % der unbehandelten PHHs HDAg-positiv; nach IFN α -Behandlung finden sich nach 7 Tagen 4,7 % und nach 14 Tagen 1,4 % HDAg-positive Zellen.

4.1.2 IFN α führt zu einer Reduktion von HBV-RNA und HBsAg, nicht jedoch der HBV-DNA

Bei der Anzahl der intrazellulär quantifizierten HBV-DNA-Kopien pro Zelle (Abbildung 14A) zeigte sich lediglich nach 7 Tagen eine leichte Reduktion der Viruslast nach IFN α -Gabe (0,2-log, entsprechend 33 %). Während die HBV-DNA im Verlauf nach 14 Tagen in den unbehandelten Kontrollen stark abfiel (0,5-log, entsprechend 71 %), blieb die intrazelluläre Viruslast nach IFN α -Behandlung zu diesem Zeitpunkt konstant im Vergleich zum Vorwert

nach 7 Tagen und lag damit sogar um 0,4-log (62 %) höher als in den Kontrollen. Tatsächlich zeigte sich diese Tendenz auch für die HBV-cccDNA (Abbildung 14B). Allerdings kam es bei den Messwerten nach 14 Tagen zu starken Schwankungen, sodass deren Aussagekraft unklar bleibt.

Die Gesamtmenge intrazellulärer HBV-RNA (Abbildung 14C) sank über den 14-tägigen Versuchszeitraum in unbehandelten Kontrollen um insgesamt 0,3-log (45 %) ab. Der Abfall war in IFN α -behandelten Gruppen jedoch stärker vorhanden: Nach 7 Tagen erzeugte IFN α eine Reduktion der HBV-RNA um 0,2-log (32 %) mehr als in Kontrollen und nach 14 Tagen lag der Unterschied bei 0,4-log (63 %). Der Abfall vom Ausgangswert der Kontrollgruppe nach 7 Tagen und dem Wert nach 14 Tagen IFN α -Behandlung betrug insgesamt 0,7-log (80 %). Die intrazelluläre Expression der HBV-pgRNA (Abbildung 14D) sank in unbehandelten Kontrollen um insgesamt 0,4-log (63 %) ab. Auch hier war dieser Effekt wieder durch IFN α verstärkt, sodass der Gesamtabfall im Vergleich zu den Kontrollen nach 7 Tagen am Ende der 14-tägigen Behandlung bei 0,7-log (80 %) lag. Bei Betrachtung der Werte nach 7 und 14 Tagen im direkten Vergleich findet sich nach IFN α -Behandlung im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen eine Reduktion der HBV-pgRNA um 0,2-log (38 %) nach 7 Tagen und nach 14 Tagen um 0,3-log (46 %).

Bezüglich der im Zellkulturüberstand gemessenen HBV-Parameter zeigte sich ein leichter Abfall von sowohl HBV-DNA als auch HBsAg im Verlauf des Versuches in allen Zellen. Die Reduktion wurde jedoch durch IFN α weiter verstärkt, sodass sich nach 14 Tagen ein Unterschied in Höhe von 0,2-log (32 %) bei der extrazellulären HBV-DNA (Abbildung 14E) und 0,7-log (78 %) beim HBsAg (Abbildung 14F) zeigte.

Zusammenfassend kam es somit zu einer Reduktion aller viralen HBV-Parameter auch in den unbehandelten Kontrollen im Verlauf des Versuches, wobei die intrazellulär gemessene HBV-RNA und extrazelluläre HBV-DNA sowie HBsAg durch IFN α -Behandlung zusätzlich abfielen. Lediglich die intrazelluläre HBV-DNA zeigte kein Ansprechen auf IFN α .

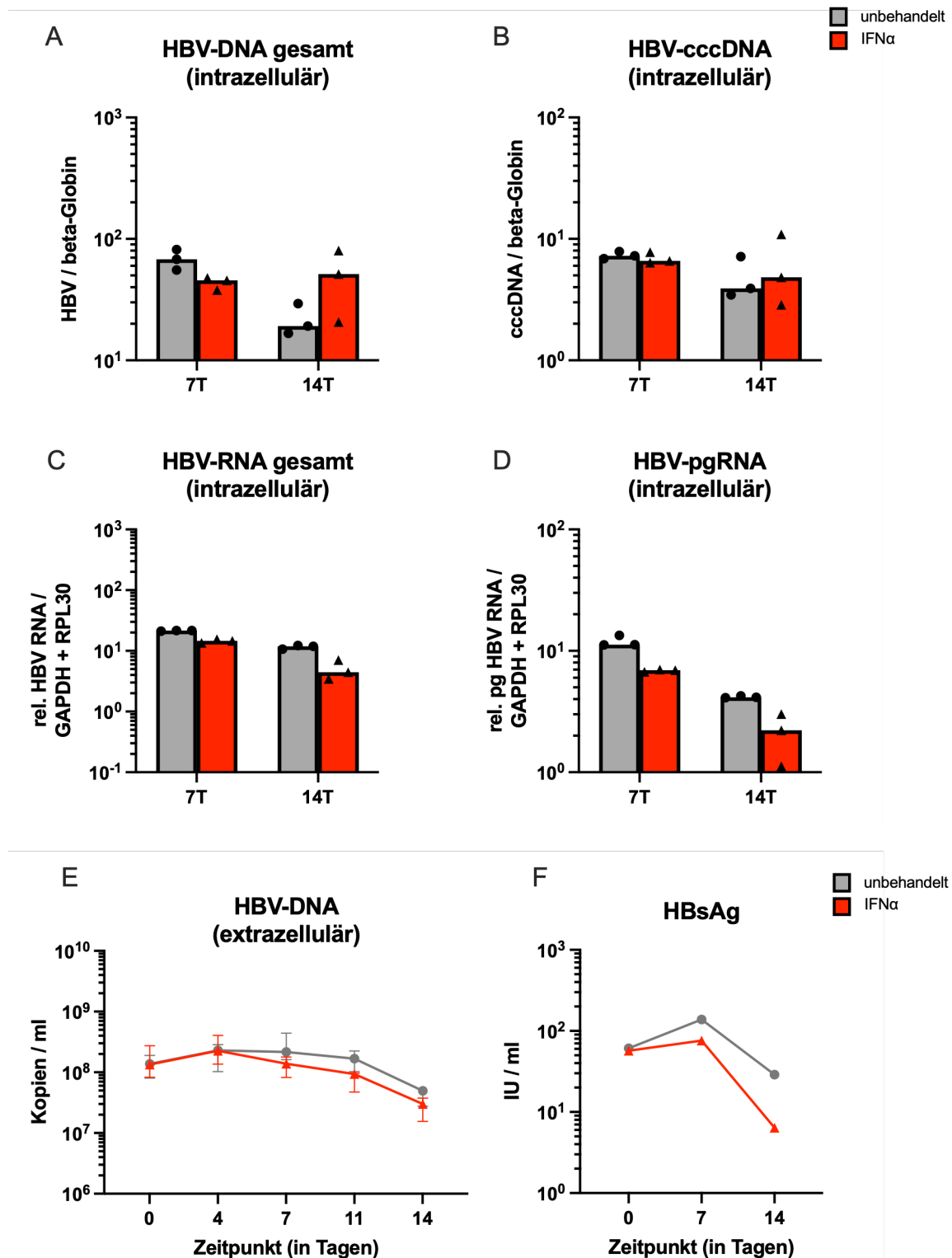


Abbildung 12: HBV-Parameter nach IFN α -Gabe in HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs

Vergleich der HBV-Viruslast in koinfizierten PHHs nach 7 und 14 Tagen Behandlung mit IFN α (rot) und in unbehandelten Kontrollen (grau). A) Gesamte intrazelluläre HBV-DNA pro beta-Globin-Kopie. B) Intrazelluläre HBV-cccDNA pro beta-Globin-Kopie. C) Gesamte intrazelluläre HBV-RNA, normalisiert auf humane Housekeeper-Gene GAPDH und RPL30. D) Intrazelluläre HBV-pgRNA, normalisiert auf humane Housekeeper-Gene GAPDH und

RPL30. E) Extrazelluläre HBV-DNA im Zellkulturüberstand vor dem jeweiligen Mediumwechsel. F) Extrazelluläres HBsAg im Zellkulturüberstand vor dem jeweiligen Mediumwechsel.

4.1.3 Verstärkung der intrinsischen ISG-Expression durch IFN α

Die Messung verschiedener klassischer ISGs auf mRNA-Ebene zeigte eine intrinsische Interferonantwort der Hepatozyten auf die anhaltende HBV/HDV-1p-Infektion (Abbildung 15). In den unbehandelten Kontrollen fand sich für ISG15 nach 14 Tagen ein Anstieg um 0,8-log (6-fache Erhöhung) zum Ausgangswert nach 7 Tagen. Bei Mx1 lag die Zunahme bei 1,0-log (9-fache Erhöhung), bei Stat1 bei 0,6-log (3-fache Erhöhung) und für CXCL10 zeigte sich eine Steigerung um 1,1-log (12-fache Erhöhung). Zusätzlich wurde der Effekt der ISG-Induktion durch die Gabe von IFN α teilweise weiter verstärkt. Nach 7 Tagen kam es bei IFN α -Gabe im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zu einer 29-fachen Zunahme der ISG15-Expression um 1,5-log und nach 14 Tagen im Vergleich zu den ohnehin schon höheren Werten bei den unbehandelten Kontrollen zu einer weiteren 5-fachen Steigerung um 0,7-log. Bei Mx1 und Stat1 fanden sich ähnliche Erhöhungen: Nach 7 Tagen IFN α stieg die ISG-Induktion um 1,2-log (15-fach) für Mx1 und 0,7-log (5-fach) für Stat1 im Vergleich zu den Kontrollen, und nach 14 Tagen um 0,4-log für Mx1 (3-fach) und 0,3-log (2-fach) für Stat1.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte zudem eine leichte Zunahme von HLA im Verlauf des Versuches in unbehandelten Kontrollen und eine zusätzliche Steigerung durch IFN α -Gabe, insbesondere nach 7 Tagen, visualisiert werden (Abbildung 16). Dabei scheint das fluoreszierende human-spezifische HLA-Signal nach 7 und 14 Tagen insbesondere in HDAg-negativen humanen Zellen möglicherweise stärker vorhanden zu sein als in HDAg-positiven Zellen.

Interessanterweise zeigte sich im Vergleich dazu bei der CXCL10-Messung weder nach 7 noch nach 14 Tagen ein wesentlicher Unterschied zwischen IFN α - und Kontrollgruppen. Die intrinsische ISG-Induktion war in diesem Fall in unbehandelten Zellen sogar um 0,2-log höher als in der IFN α -Gruppe.

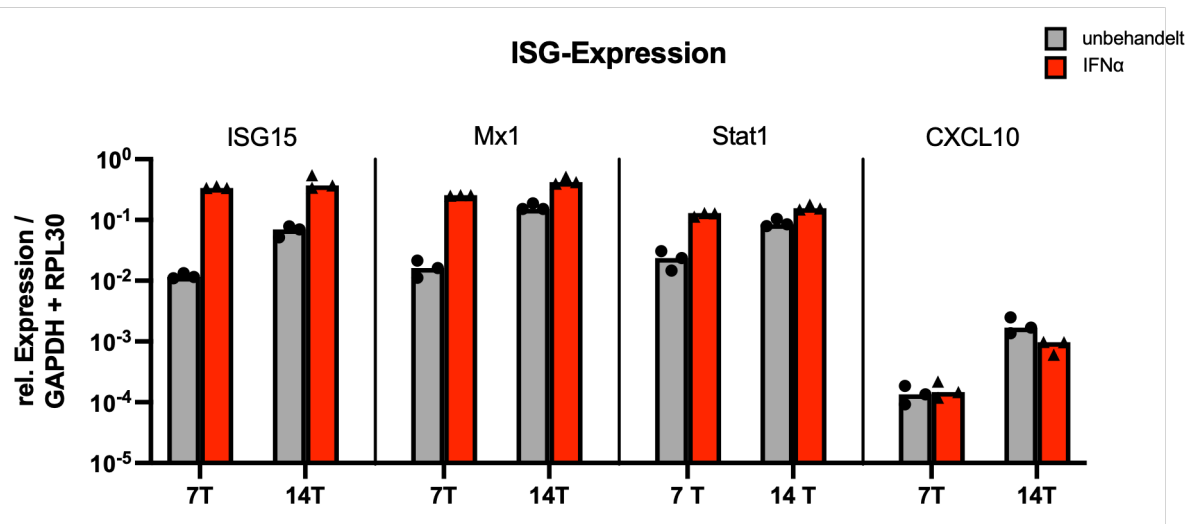


Abbildung 13: ISG-Expression nach IFNα-Gabe in HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs

Relative Expression, normalisiert auf humane Housekeeper-Gene GAPDH und RPL30, von ISG15, Mx1, Stat1 und CXCL10 nach 7 und 14 Tagen in IFNα-behandelten PHHs (rot) und unbehandelten Kontrollen (grau).

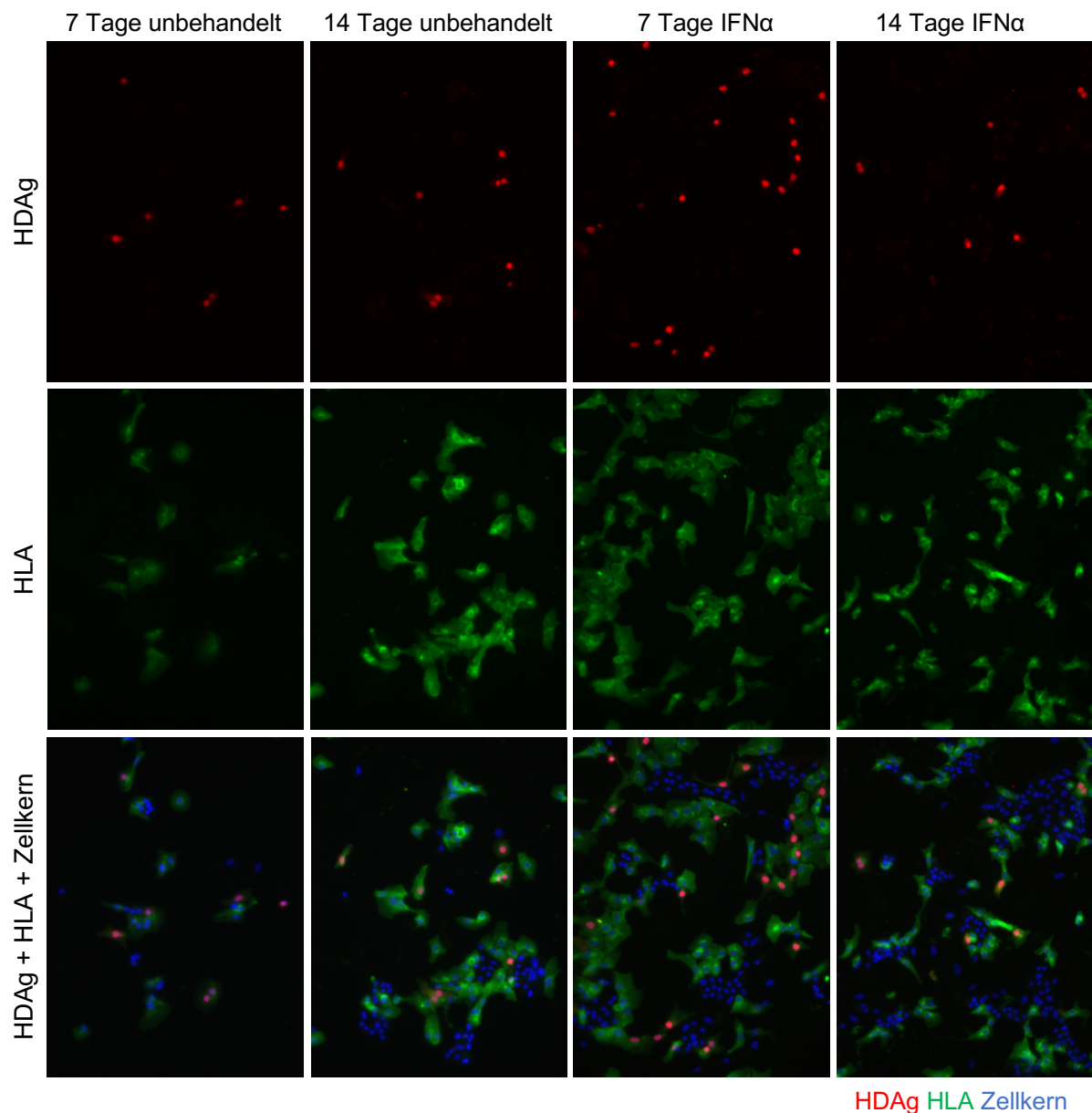


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von HDAg und HLA nach IFN α -Behandlung in HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs

Vergleich von HDAg (oben), HLA (Mitte) und gleichzeitiger Darstellung von HDAg, HLA und Zellkernen (unten) nach 7 und 14 Tagen IFN α -Behandlung und in unbehandelten Kontrollen.

4.1.4 Konstante Gesamtzellzahl und NTCP-Expression mit und ohne IFN α -Behandlung

Um sicher zu stellen, dass die Reduktion der HDV-RNA und der HBV-RNA sowie HBsAg nicht auf einen Verlust der Gesamtzellzahl oder Dedifferenzierung der PHHs und somit auf eine reduzierte NTCP-Expression zurückzuführen ist, wurden im Folgenden die vorhandene Menge an intrazellulärer RNA und die Anzahl der beta-Globin-Kopien pro ng DNA in den einzelnen Gruppen bestimmt. Hieraus lässt sich eine grobe Interpretation der Veränderung der Zellmengen ableiten.

Bezüglich der Gesamt-RNA in ng (Abbildung 17A) fand sich eine leichte Reduktion über die Versuchsdauer in allen Zellen. Bei den unbehandelten Kontrollen stellte sich eine Reduktion um 0,1-log (27 %) ein, wobei der RNA-Verlust nach IFN α -Gabe etwas stärker vorhanden war: nach 7 Tagen fand sich eine Reduktion um 0,1-log (27 %) im Vergleich zu den Kontrollen und nach 14 Tagen lag der Unterschied bei 0,2-log (34 %). Die IFN α -behandelten PHHs zeigten nach 14 Tagen gegenüber den unbehandelten Kontrollen nach 7 Tagen einen Abfall um 0,3-log (52 %) ng RNA.

Die absolute Anzahl der beta-Globin-Kopien (Abbildung 17C) sank über die Zeit ebenfalls in den unbehandelten Kontrollen (Reduktion um 0,4-log oder 61 % nach 14 Tagen ohne Behandlung) und war in IFN α -behandelten Gruppen noch etwas niedriger. Hier fand sich nach 7 Tagen eine Reduktion um 0,1-log (18 %) nach IFN α -Gabe und nach 14 Tagen um 0,2-log (42 %) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Bei Relativierung der beta-Globin-Kopien pro Gesamtmenge an DNA, gemessen in ng (Abbildung 17D), wurde dieser Unterschied hingegen ausgeglichen und blieb über den gesamten Versuchszeitraum stabil.

Weiterhin kam es zu einer leichten Reduktion der NTCP-Expression über die Versuchsdauer (Abbildung 17B). In den Kontrollen fiel sie nach 14 Tagen um 0,2-log (37 %) im Vergleich zum Ausgangswert nach 7 Tagen ab und nach IFN α -Behandlung war die NTCP-Expression nach 7 Tagen um 0,4-log (63 %) und nach 14 Tagen um 0,2-log (32 %) geringer als in den jeweiligen Kontrollen.

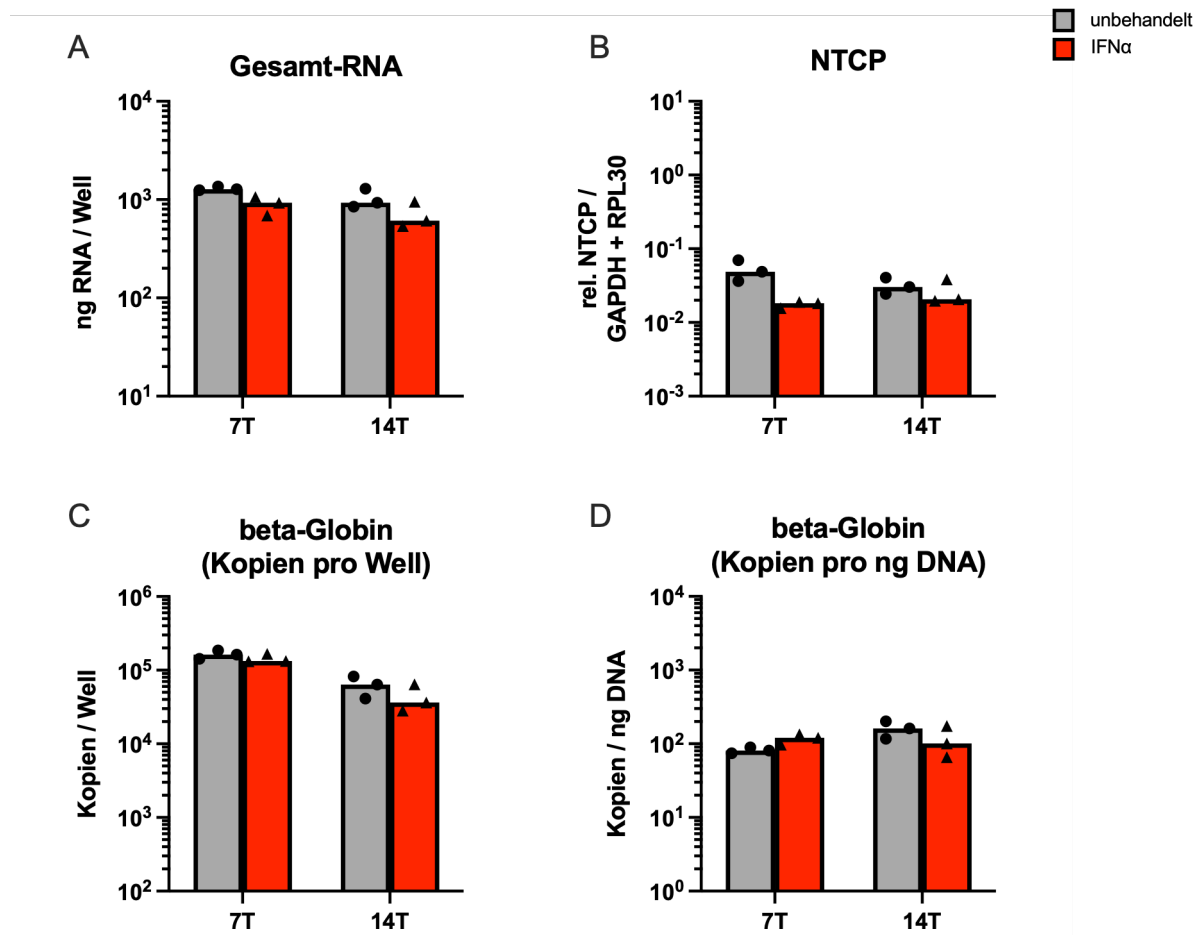


Abbildung 15: Zellzahlparameter und NTCP-Expression in HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs nach IFN α -Behandlung

Vergleich nach 7 und 14 Tagen IFN α -Behandlung (rot) mit unbehandelten Kontrollen (grau). A) Gesamtmenge an RNA in ng pro Well. B) Relative NTCP-Expression im Vergleich zu humanen Housekeeper-Genen GAPDH und RPL30. C) Absolute Anzahl an Kopien von intrazellulärem beta-Globin pro Well. D) Beta-Globin-Kopien pro ng DNA.

4.2 In vitro Interferonbehandlung von in vivo HBV-infizierten PHHs nach HDV-1p-Superinfektion in vitro

Wie in Abschnitt 2.2.3.1 erläutert wurden primäre humane Hepatozyten, welche bereits mehrere Wochen in vivo in einer humanisierten Maus HBV-infiziert waren, isoliert und eine HDV-1p-Superinfektion in vitro vorgenommen. Als Zeitpunkt Baseline wurde der zehnte Tag nach Superinfektion festgelegt, ab welchem eine Therapie mit IFN α für 7 beziehungsweise 14 Tage begonnen wurde. Es wurden zudem nicht HDV-infizierte Kontrollen, die dementsprechend eine HBV-Monoinfektion aufwiesen, mitgeführt. Auch diese wurden für bis zu 14 Tage mit IFN α behandelt.

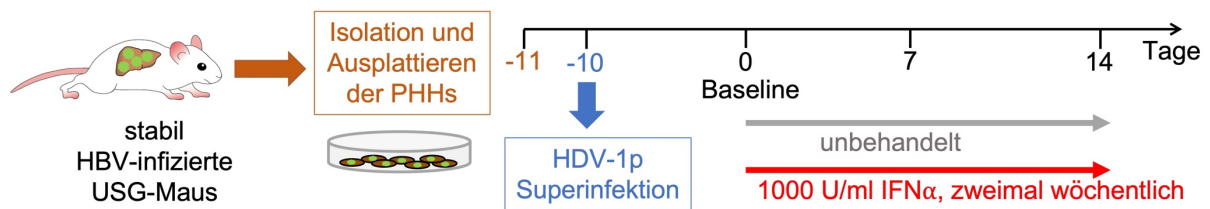
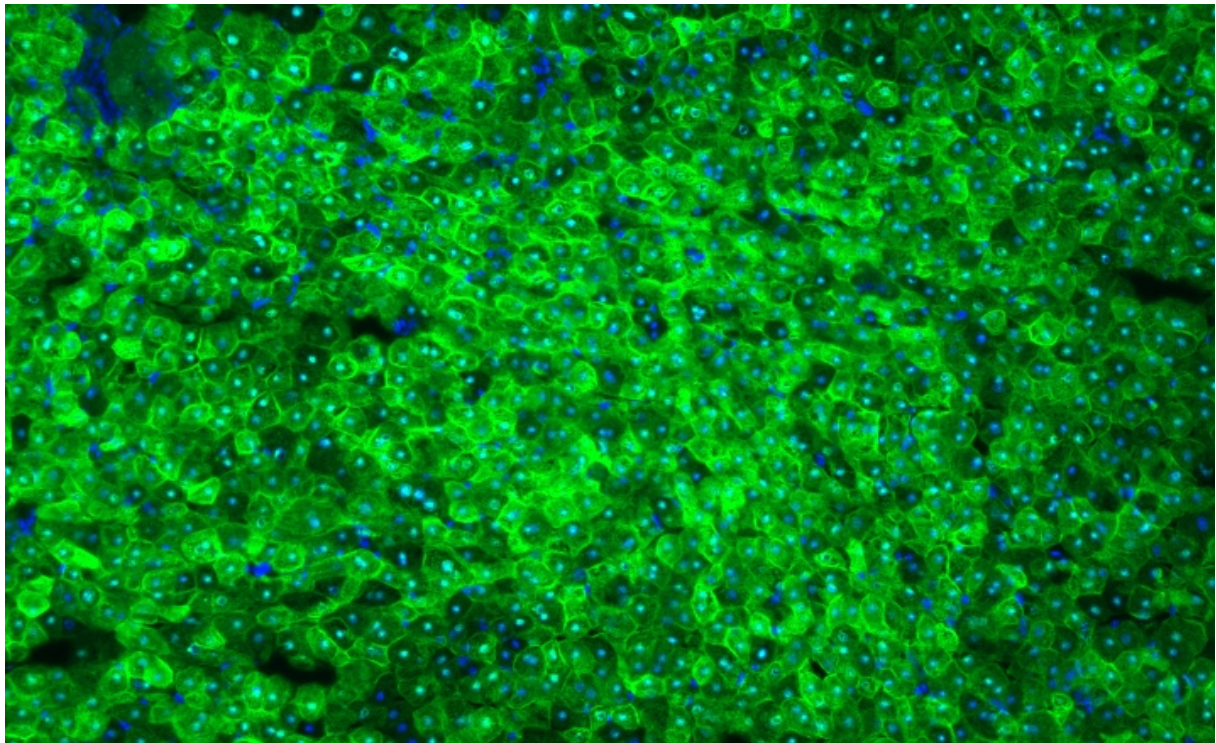


Abbildung 16: Versuchsaufbau mit HBV-infizierten PHHs und HDV-1p-Superinfektion in vitro

Stabil HBV-infizierte PHHs wurden nach 15 Wochen aus einer Leber-chimären Maus isoliert, ausplattiert und in vitro mit HDV-1p superinfiziert. 10 Tage nach Superinfektion (= Baseline) wurden die Zellen für bis zu 14 Tage mit 1000 IU/ml IFN α behandelt oder als unbehandelte Kontrollen mitgeführt.

Die Maus hatte zum Zeitpunkt der Zellisolation bereits eine stabile HBV-Infektion mit einer Viruslast in Höhe von 7×10^9 Kopien HBV-DNA pro ml im Endserum. Die intrazelluläre Analyse des verbliebenen Lebergewebes ergab $1,5 \times 10^3$ Kopien HBV-DNA pro humaner Zelle und eine Repopulationsrate von 61 % humaner Hepatozyten (Daten nicht abgebildet). Abbildung 19 zeigt die Immunfluoreszenzfärbung des HBcAg im Lobus caudatus der entsprechenden Maus, in welcher nahezu alle Hepatozyten HBV-positiv sind.



HBcAg Zellkerne

Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung der Leber einer HBV-infizierten Maus

Immunfluoreszenzfärbung des Lobus caudatus der für die Zellkultur genutzten, HBV-infizierten Maus in 10-facher Vergrößerung. Dargestellt sind das HBcAg (grün) und die Zellkerne (blau).

4.2.1 Infizierte PHHs können über mindestens 25 Tage ohne Zellverlust durch IFN α -Behandlung in Kultur gehalten werden

Sowohl die HBV- als auch HBV/HDV-1p-infizierten PHHs waren über den gesamten Zeitraum stabil als Zellkultur führbar. Den gesamten Zeitraum über kam es zu keinen relevanten Zellverlusten, was sich durch die gemessene Gesamtmenge an ng RNA objektivieren ließ. Dabei machte sich weder ein relevanter Unterschied zwischen HBV-Monoinfektion oder Superinfektion mit HDV-1p bemerkbar, noch fand sich eine wesentliche Differenz der Zellzahl zwischen IFN α -behandelten Zellen und unbehandelten Kontrollen (Abbildung 20A). Gleiches galt auch für die absolute Anzahl an beta-Globin-Kopien pro Well und dessen Relation zur Gesamt-DNA-Menge in ng (Abbildungen 20B und 20C). Weder zeigte sich ein Abfall nach HDV-1p-Superinfektion noch trat eine Reduktion durch IFN α auf.

Zur Überprüfung, dass es sich bei der gemessenen Gesamt-DNA-Menge nicht auch um murine Zellen handelt, wurde das Verhältnis von beta-Globin (humanes Gen) zu beta-Actin (murines Gen) aufgewogen. Hierbei zeigte sich eine nahezu bei 100 % liegender Anteil des

beta-Globins (Daten nicht abgebildet), sodass eine Verunreinigung mit murinen Hepatozyten nahezu ausgeschlossen werden kann.

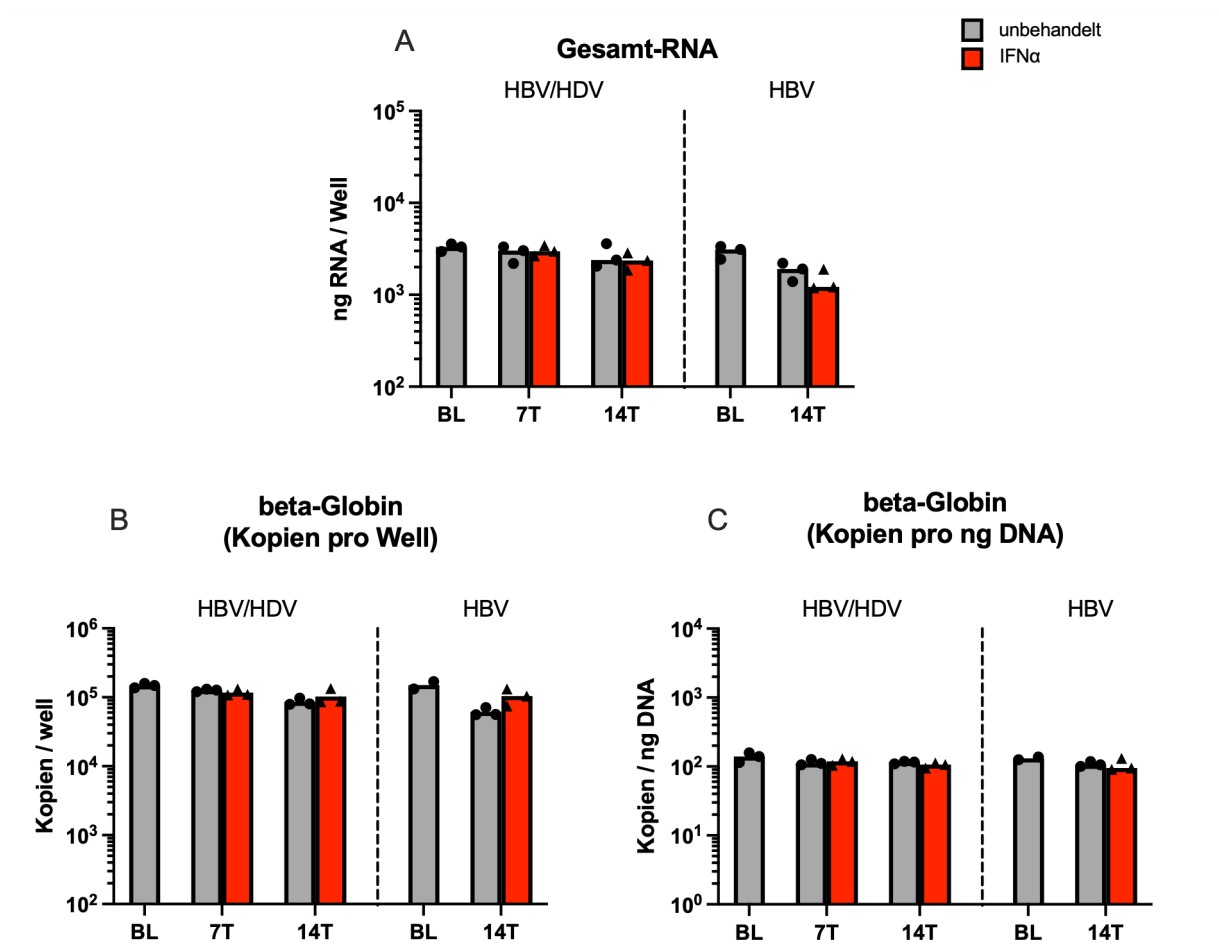


Abbildung 18: Zellzahl-Parameter in HDV-1p-superinfizierten PHHs nach IFN α -Gabe

Vergleich nach 7 und 14 Tagen IFN α -Behandlung (rot) mit unbehandelten Kontrollen (grau).
A) Gesamtmenge an RNA in ng pro Well. B) Absolute Anzahl an Kopien von intrazellulärem beta-Globin pro Well. C) Beta-Globin-Kopien pro ng DNA.

4.2.2 HDV-Spreading in vitro dauert mindestens 24 Tage an und wird durch IFN α gebremst

Bereits wenige Tage nach HDV-1p-Superinfektion war HDV-RNA im Zellkulturüberstand messbar (Abbildung 21B). 6 Tage nach Infektion wurde die erste Messung im Überstand durchgeführt, bei der sich eine extrazelluläre Viruslast in Höhe von $5,6 \times 10^2$ Kopien pro ml zeigte. Entgegen der zuvor aufgestellten Hypothese, dass sich spätestens 10 Tage nach

Superinfektion ein konstantes HDV-Niveau eingependelt haben würde, kam es in den unbehandelten Kontrollen bis zum Ende des Versuches zu einem Anstieg der extrazellulären HDV-RNA. Beim letzten Zeitpunkt der Messung lag die HDV-RNA in den unbehandelten Kontrollen bei $1,2 \times 10^6$ und ist im Vergleich zum ersten Messwert um insgesamt 3,3-log gestiegen. Auch die intrazellulären Messungen ergaben eine steigende Virusmenge über die gesamte Versuchsdauer. So fand sich zum Zeitpunkt 7 Tage (insgesamt 17 Tage nach Superinfektion) eine Zunahme der HDV-RNA um 0,8-log im Vergleich zur Baseline und nach 14 Tagen (24 Tage nach Superinfektion) stieg die HDV-RNA weiter um 1,2-log. Die Differenz zwischen Baseline und letztem Messzeitpunkt betrug 2,1-log (Abbildung 21A).

Gleichzeitig konnte die Verabreichung von IFN α die HDV-Ausbreitung zwar nicht verhindern, bremste den Anstieg im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen jedoch deutlich ab. Bereits 7 Tage nach IFN α -Gabe kam es zu einer Reduktion der intrazellulären HDV-RNA um 0,2-log (44 %) und nach 14 Tagen betrug die Menge 0,9-log (87 %) weniger als in den Kontrollen. Der Anstieg der intrazellulären Virusmenge zwischen Baseline und Beendigung der 14-tägigen Behandlung konnte von 2,1-log in den Kontrollen auf 1,2-log (Reduktion um 216 %) gesenkt werden (Abbildung 21A). Der Effekt von IFN α zeigte sich im Überstand erstmals 3 Tage nach Beginn der Medikamentengabe, wo die IFN α -behandelten Zellen 0,2-log (39 %) weniger extrazelluläre HDV-RNA aufwiesen als die Kontrollen. Ab dem 10. Behandlungstag konnte die Zunahme vollständig aufgehalten werden und es kam zwischen bis zum 14. Tag sogar zu einer leichten Reduktion um 0,2-log (43 %). Der Unterschied zwischen der IFN α -behandelten Gruppe und der entsprechenden Kontrolle betrug nach 14 Tagen 1,1-log, was einer Reduktion um IFN α -assoziierten Reduktion der HDV-RNA um 91 % entspricht (Abbildung 21B).

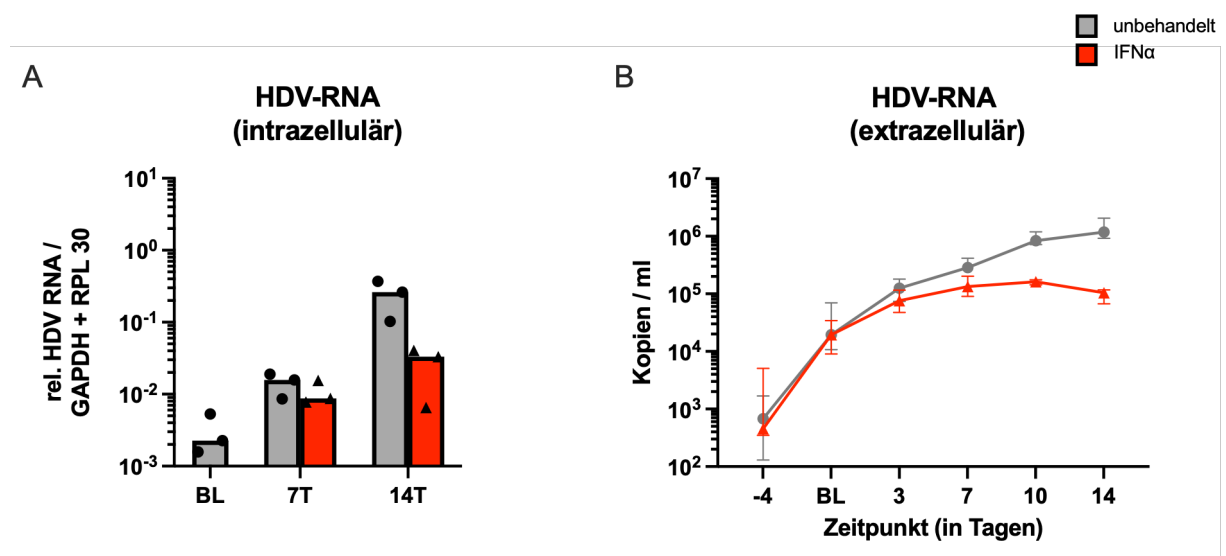


Abbildung 19: HDV-RNA nach IFN α -Behandlung in HDV-1p-superinfizierten PHHs

A) Intrazelluläre HDV-RNA in HBV/HDV-1p-infizierten PHHs, normalisiert auf die humanen Housekeeper-Gene GAPDH und RPL30 nach 7 und 14 Tagen Behandlung mit IFN α (rot) und in unbehandelten Kontrollen (grau). B) Extrazelluläre HDV-RNA in IU/ml im Zellkulturüberstand vor dem jeweiligen Mediumwechsel in IFN α -behandelten Zellen (rot) und unbehandelten Kontrollen (grau). BL = Baseline.

4.2.3 Reduktion aller intra- und extrazellulären HBV-Parameter durch IFN α

In allen Behandlungsgruppen, also sowohl in HBV- als auch HBV/HDV-1p-infizierten Zellen, führte IFN α zu einer Reduktion von HBV-pgRNA, HBV-DNA, HBV-cccDNA und HBsAg (Abbildung 22 und 23). Ein wesentlicher Unterschied zwischen den nur mit HBV infizierten Zellen und denen mit HDV-1p-Superinfektion fiel dabei nicht auf. Die Veränderung der cccDNA fiel insgesamt am wenigstens ins Gewicht, da sich hier nur eine sehr leichte Veränderung feststellen ließ.

Zur Baseline fand sich kein relevanter Unterschied bezüglich aller HBV-Parameter zwischen HBV- und HBV/HDV-1p-infizierten Zellen. Intrazelluläre HBV-DNA, HBV-cccDNA und HBV-pgRNA (Abbildung 22) sowie extrazelluläre HBV-DNA, HBsAg und HBeAg (Abbildung 23) waren in allen Kontrollen in jeweils vergleichbarer Menge vorhanden. Auch im Verlauf des Versuches ließ sich keine eindeutige HBV-Suppression in den HDV-1p-infizierten Zellen im Vergleich zu den HBV-infizierten Zellen feststellen.

Bezüglich der intrazellulären HBV-DNA fand sich in den HDV-1p-superinfizierten Zellen 7 Tage nach IFN α -Behandlung eine Reduktion um 0,3-log (46 %) und nach 14 Tagen um 0,7-log (81 %) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Abbildung 22A). In der Gruppe der HBV-Monoinfektion fand sich bei einer Reduktion der intrazellulären HBV-DNA in Höhe von 0,6-log (60 %) ebenfalls ein Ansprechen auf IFN α . Auf die intrazelluläre HBV-cccDNA hatte IFN α in HDV-1p-infizierten Zellen erst nach 14 Tagen einen leichten Effekt. Hierbei zeigte sich eine Reduktion um 0,1-log (20 %) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abbildung 22B). In den HBV-monoinfizierten Zellen fand sich 14 Tage nach Beginn der Behandlung ebenfalls eine Reduktion um 0,1-log (17 %). Ähnlich wie auch die Gesamt-HBV-RNA (Abbildung 22C) fiel auch die relative Expression der intrazellulären HBV-pgRNA (Abbildung 22D) über den Versuchszeitraum nach 14 Tagen sowohl in unbehandelten HBV-infizierten als auch HDV-1p-superinfizierten Zellen um 0,3-log (51 bis 54 %) ab, wohingegen sich nach 7 Tagen noch eine stabile Expression in den HDV-1p-infizierten Kontrollen zeigte. Die Abnahme der HBV-pgRNA wurde in allen Gruppen durch IFN α verstärkt, wobei in diesem Fall die HBV-monoinfizierten Zellen mit einer Reduktion um 0,1-log (16 %) die

schwächste Veränderung aufwiesen. Die HDV-infizierten PHHs zeigten eine Verringerung um 0,3-log (52 %) nach 7 und weitere 0,2-log (41 %) nach 14 Tagen IFN α -Behandlung.

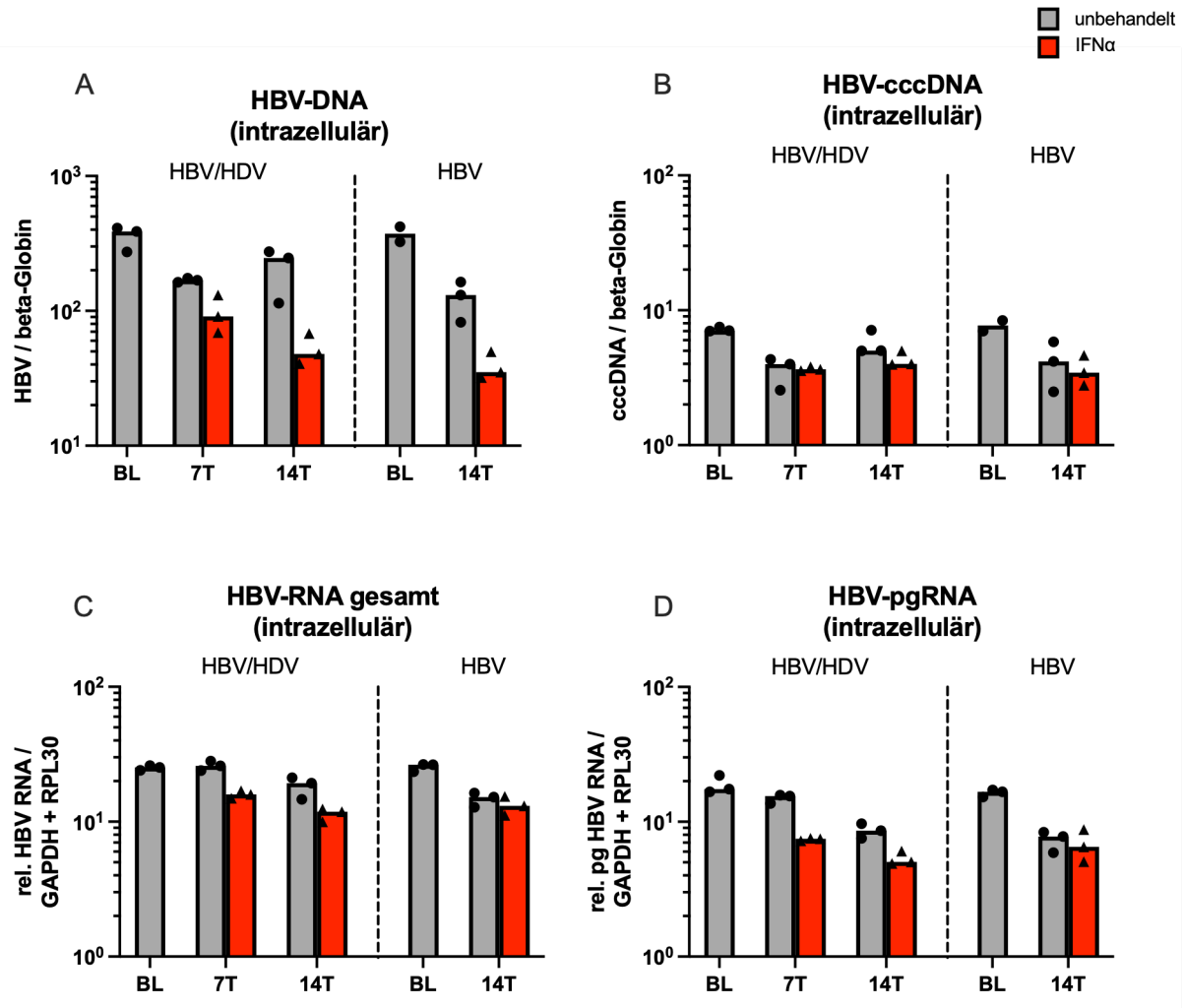


Abbildung 20: Intrazelluläre HBV-Parameter in HDV-1p-superinfizierten PHHs nach IFN α -Gabe

Vergleich der intrazellulären HBV-Viruslast in 7 oder 14 Tage lang mit IFN α -behandelten PHHs (rot) mit unbehandelten Kontrollen (grau) in HDV-1p-superinfizierten PHHs (= HBV/HDV) oder HBV-monoinfizierten Zellen (= HBV). BL = Baseline. A) Gesamte intrazelluläre HBV-DNA pro beta-Globin-Kopie. B) Intrazelluläre HBV-cccDNA pro beta-Globin-Kopie. C) Gesamte intrazelluläre HBV-RNA, normalisiert auf humane Housekeeper-Gene GAPDH und RPL30. D) Intrazelluläre HBV-pgRNA, normalisiert auf humane Housekeeper-Gene GAPDH und RPL30.

Auch im Überstand imponierte eine deutliche Verringerung der HBV-Viruslast nach IFN α -Gabe (Abbildung 23). Bezüglich der HBV-DNA schlug die Behandlung in den HDV-1p-superinfizierten Zellen bereits nach 3 Tagen (Reduktion um 0,3-log, entsprechend 46 %) und

somit etwas früher an als in den HBV-infizierten Zellen, wo sich der Effekt erst nach 7 Tagen (Reduktion um 0,4-log, entsprechend 63 %) eindeutig bemerkbar machte. Am Ende des Versuches nach 14-tägiger Behandlung hatten die HDV-1p-infizierten Zellen 0,7-log (80 %) weniger HBV-DNA im Überstand als die Kontrollen und bei den HBV-monoinfizierten Zellen waren es 0,6-log (75 %) weniger Kopien pro ml. Insgesamt fiel die extrazelluläre HBV-DNA in den HDV-1p-infizierten und HBV-monoinfizierten Kontrollen über die gesamte Versuchsdauer zwar um jeweils 0,3-log (49 %) im Vergleich zur Baseline ab, dieser Unterschied war in den IFN α -behandelten Zellen jedoch mit 1,0-log (90 %) bei den HDV-1p-infizierten und 0,9-log (87 %) bei den HBV-infizierten PHHs deutlich größer (Abbildung 23A). Das im Überstand gemessene HBsAg (Abbildung 23B) fiel in IFN α -behandelten Zellen ebenfalls leicht ab. Nach 7 Tagen zeigte sich in HBV-infizierten und superinfizierten Zellen jeweils eine Reduktion des HBsAg um 0,2-log (35 %) im Vergleich zu den Kontrollen. Nach 14 Tagen fand sich mit 0,3-log (47 %) eine größere Abnahme des HBsAg in den HBV-monoinfizierten Zellen im Vergleich zu den superinfizierten PHHs mit einer Abnahme um lediglich 0,1-log (25 %). Die gleiche Tendenz zeigte sich auch für beim HBeAg (Abbildung 23C), wobei die Unterschiede hier geringgradig größer waren: nach 7 Tagen stellte sich bei HDV-1p-infizierten Zellen eine Reduktion um 0,4-log (62 %) und nach 14 Tagen um 0,3-log (44 %) durch IFN α -Behandlung ein und in HBV-monoinfizierten kam es zu einer Abnahme in Höhe von 0,5-log (66 %) nach 7 und 0,4-log (60 %) nach 14 Tagen.

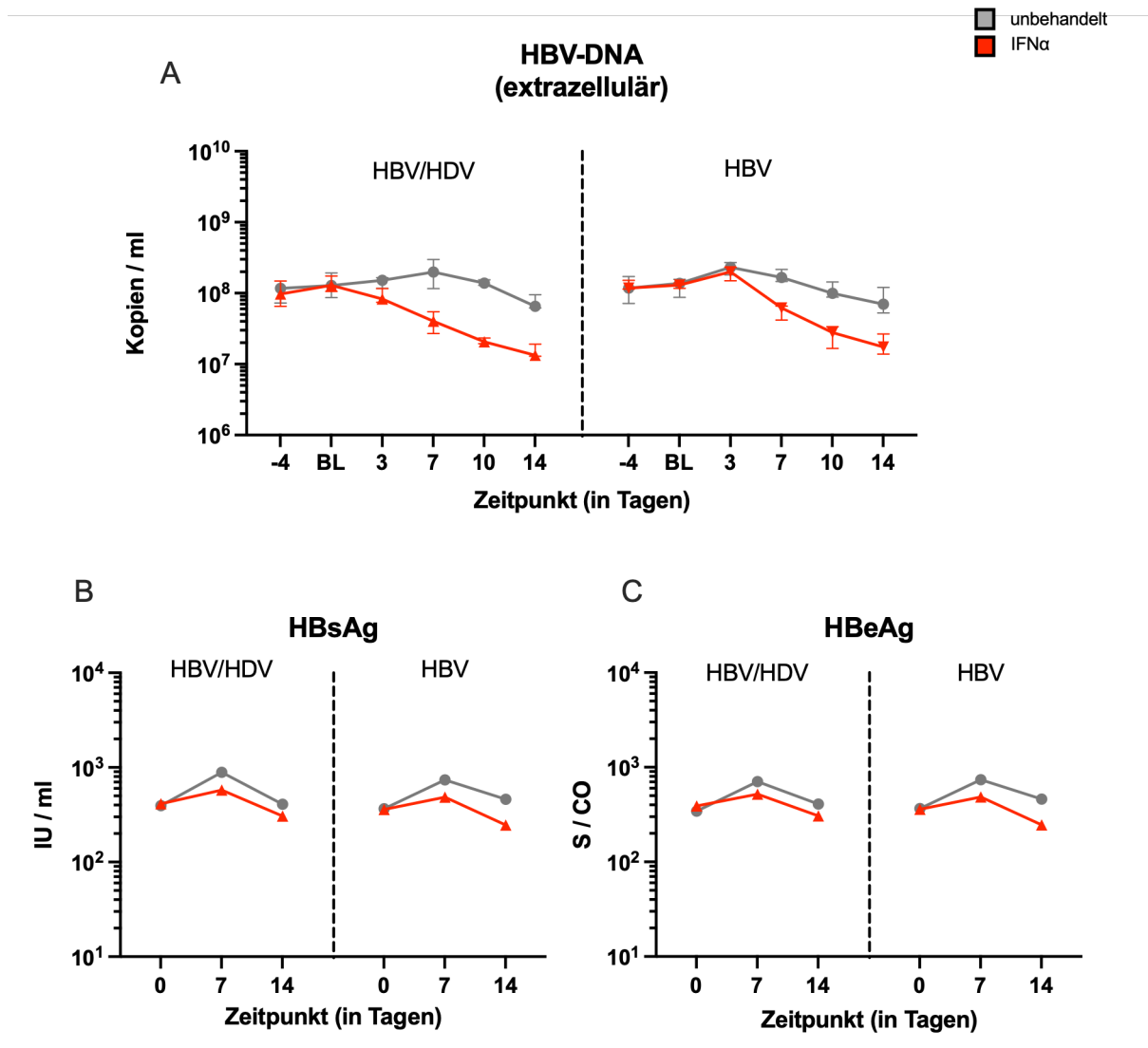


Abbildung 21: Extrazelluläre HBV-Parameter in HDV-1p-superinfizierten PHHs nach IFNα-Gabe

Extrazelluläre HBV-Viruslast in unbehandelten Kontrollen (grau) und mit IFNα-behandelten (rot) PHHs. Vergleich von HDV-1p-superinfizierten Zellen (= HBV/HDV) mit HBV-monoinfizierten PHHs (= HBV). BL = Baseline. A) Extrazelluläre HBV-DNA im Zellkulturüberstand vor dem jeweiligen Mediumwechsel. Extrazelluläres HBsAg (B) und HBeAg (C) im Zellkulturüberstand vor dem jeweiligen Mediumwechsel.

4.2.4 Späte intrinsische HDV-induzierte ISG-Expression wird durch IFNα verstärkt

Während die ISG-Induktion in den HDV-infizierten Kontrollen zwischen den Zeitpunkten Baseline und 7 Tagen unverändert blieb, fiel erst nach 14 Tagen (insgesamt also 24 Tage nach HDV-1p-Superinfektion) ein deutlicher Anstieg der Expression um das 5- bis 21-Fache bei den klassischen ISGs ISG15, Mx1, Stat1 und CXCL10 auf (Abbildung 24). Im Vergleich

dazu kam es in den HBV-monoinfizierten Kontrollen lediglich zu einer minimalen Steigerung der Expression von ISG 15 und CXCL10 (1,5- beziehungsweise 1,9-fache Zunahme, Abbildung 24A und 24D), während die Induktion von Stat1 und Mx1 keine wesentliche Veränderung zeigte (Abbildungen 24B und 24C). Zur Baseline war die relative Expression aller ISGs in HBV- und HBV/HDV-infizierten Zellen nahezu identisch.

IFN α erzeugte nach 7 Tagen eine starke ISG-Induktion in den HDV-superinfizierten Zellen mit einer Erhöhung um das 9-Fache der Stat1-Expression (Abbildung 24C), um das 25-beziehungsweise 32-Fache der Mx1- und CXCL10-Expression (Abbildungen 24B und 24D) sowie eine Steigerung um das 69-Fache der Expression von ISG15 (Abbildung 24A). Zwischen dem 7. und 14. Behandlungstag kam es hingegen weder zu einem Abfall noch zu einem Anstieg der Expression, welche stattdessen auf einem stabilen Niveau blieb. Die IFN α -vermittelte ISG-Induktion überstieg die HDV-getriggerte ISG-Expression nach 14 Tagen dennoch um das 2- bis 5-Fache. Auch in den HBV-monoinfizierten Zellen kam es zu einer starken ISG-Induktion durch IFN α : hier war die Veränderung bei Stat1 (12-fache Zunahme, Abbildung 24C) am geringsten und bei ISG15 (80-fache Zunahme, Abbildung 24A) am größten.

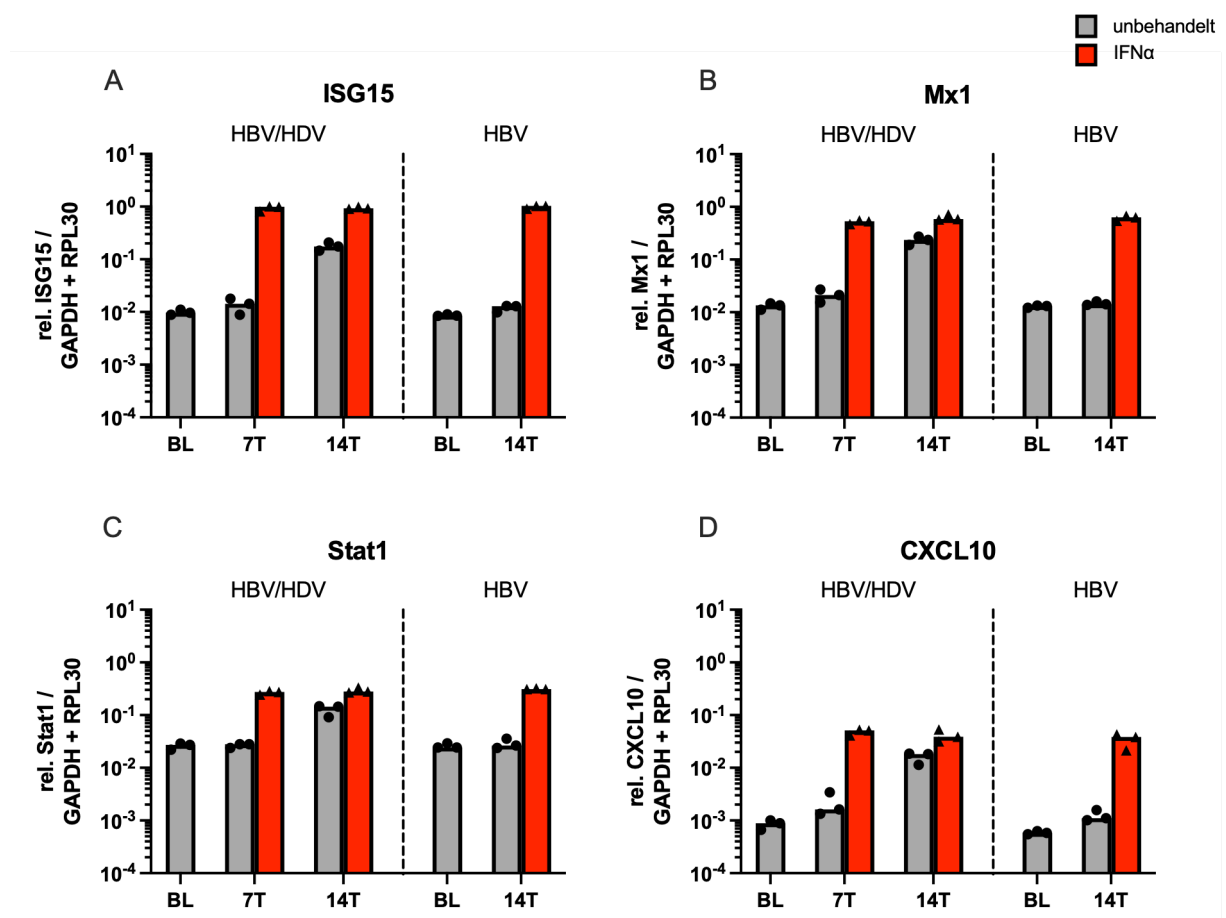


Abbildung 22: ISG-Expression nach IFN α -Gabe in HDV-1p-superinfizierten PHHs

Darstellung der Expression von ISG15 (A), Mx1 (B), Stat1 (C) und CXCL10 (D) relativ zu humanen Housekeeper-Genen nach 7 oder 14 Tagen Behandlung mit IFN α (rot) sowie in unbehandelten Kontrollen zur Baseline (= BL), nach 7 und 14 Tagen (grau). HBV/HDV = HDV-1p-superinfizierte PHHs, HBV = HBV-monoinfizierte PHHs.

4.2.5 Erhalt der NTCP-Expression unter IFN α -Behandlung

Während die relative NTCP-Expression in den HDV-superinfizierten Kontrollen nach 7 Tagen keine Veränderung im Vergleich zur Baseline zeigte, fiel nach 14 Tagen sowohl in HDV-1p-infizierten Zellen als auch in den HBV-monoinfizierten Zellen jeweils ein Abfall um 0,2-log (HDV-Superinfektion) beziehungsweise 0,3-log (HBV-Monoinfektion) auf. Bei zusätzlicher IFN α -Gabe blieb die NTCP-Expression hingegen erhalten und zeigte keinen Abfall im Vergleich zur Baseline (Abbildung 25).

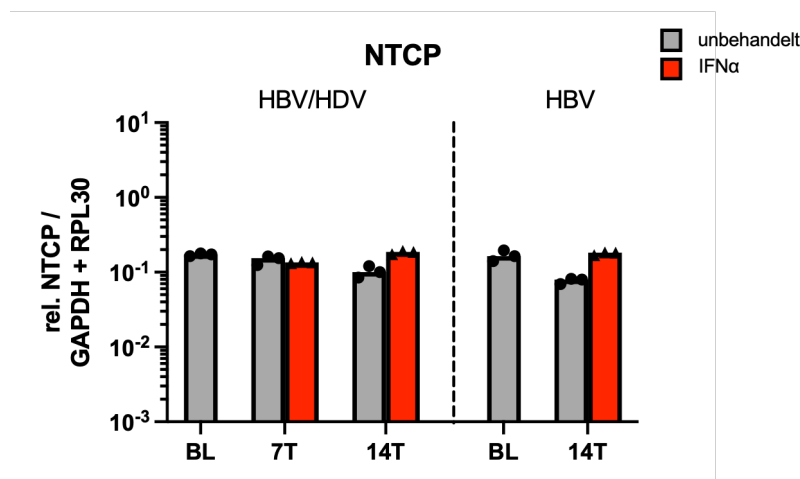


Abbildung 23: NTCP-Expression in HDV-1p-superinfizierten PHHs

Expression relativ zu humanen Housekeeper-Genen GAPDH und RPL30 in unbehandelten PHHs (grau) und nach IFN α -Behandlung (rot). BL = Baseline, HBV/HDV = HDV-1p-superinfizierte PHHs, HBV = HBV-monoinfizierte PHHs.

4.3 Etablierung einer HDV-Monoinfektion in vitro in kryokonservierten PHHs und Vergleich des Ansprechens auf IFN α von HDV-1p und HDV-1cc

Wie in Abschnitt 2.2.3.2. bereits ausführlich dargestellt wurde eine HDV-Monoinfektion in kryokonservierten PHHs etabliert. Dabei erfolgte die Infektion entweder mit dem neuen Virusstamm HDV-1p oder mit HDV-1cc, einem bereits seit Jahrzehnten in der Forschung genutzten Virusstamm (siehe Abschnitt 1.7). Die Zellen wurden ab dem 6. Tag nach Infektion (= Baseline) für insgesamt 10 Tage mit IFN α behandelt und entsprechende unbehandelte Kontrollen zum Vergleich mitgeführt.

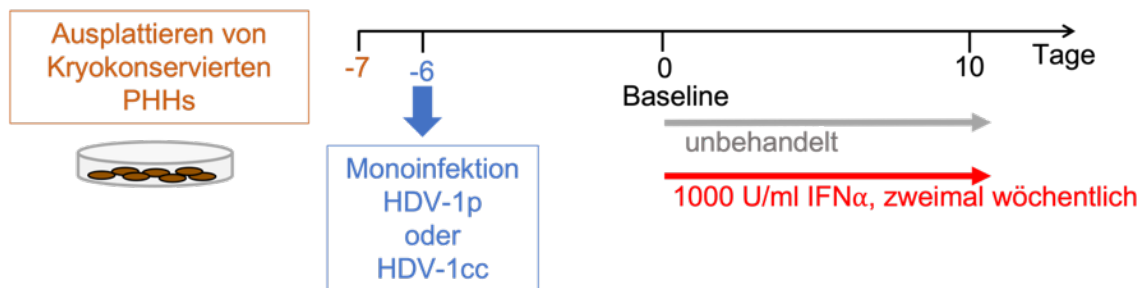


Abbildung 24: Versuchsaufbau einer HDV-Monoinfektion in kryokonservierten PHHs

Kryokonservierte PHHs wurden einen Tag nach dem Ausplattieren mit HDV-1p oder HDV-1cc infiziert und für 10 Tage mit 1000 IU/ml IFN α behandelt.

4.3.1 Leichte Reduktion der HDV-RNA durch IFN α bei HDV-1p ohne Ansprechen von HDV-1cc

Eine HDV-Monoinfektion konnte sowohl mit einer Infektion der PHHs mit HDV-1p als auch mit HDV-1cc gut etabliert werden und erreichte zum Zeitpunkt nach 10 Tagen in den Kontrollen eine mit den in den in vivo infizierten und isolierten PHHs aus den beiden vorherigen Experimenten vergleichbare Menge an relativer intrazellulärer HDV-RNA, unabhängig vom Virusstamm (Abbildung 27). Die Behandlung mit IFN α führte allgemein zu keiner starken Veränderung der HDV-RNA. Während sich jedoch bei den HDV-1p-infizierten PHHs eine leichte Reduktion um 0,1-log (22 %) nach Behandlung einstellte, kam es unter Therapie der HDV-1cc-infizierten Zellen sogar zu einem leichten Anstieg um 0,3-log (2-facher Anstieg, Abbildung 27). Da aufgrund der Abwesenheit von HBV ein HDV-Spreading nicht möglich ist, wurde kein Überstand analysiert.

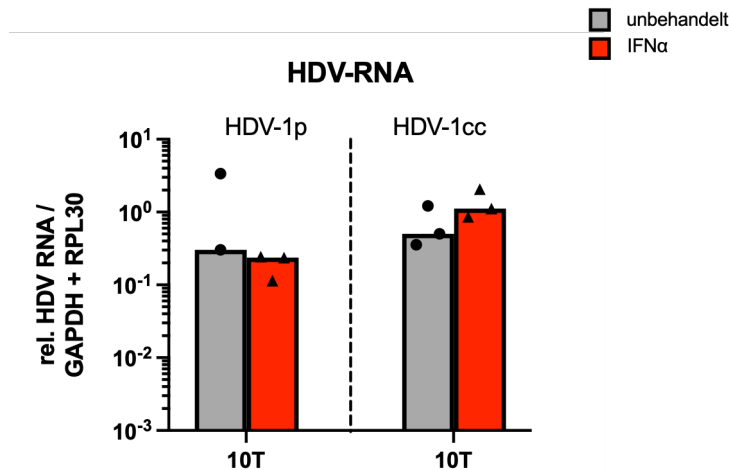


Abbildung 25: HDV-RNA in HDV-monoinfizierten PHHs nach IFN α -Gabe

Relative intrazelluläre HDV-RNA nach 10 Tagen in unbehandelten Kontrollen (grau) oder IFN α -behandelten Zellen (rot). Verglichen wurden HDV-1p-infizierte (links) oder HDV-1cc-infizierte PHHs (rechts).

4.3.2 Höhere ISG-Induktion in HDV-1cc-infizierten Zellen trotz fehlender Virussuppression durch IFN α

Entgegen der Erwartung, dass die ISGs wie in den Vorversuchen auch bei der HDV-1p-Monoinfektion durch die reine Anwesenheit von HDV-1p steigen würden, blieb dieser Effekt größtenteils aus (Abbildung 28). Lediglich bei der Induktion von CXCL10 machte sich eine Erhöhung nach 10 Tagen auch in den unbehandelten HDV-1p-infizierten Kontrollen um 1,0-log (10-fache Zunahme, Abbildung 28D) bemerkbar, wohingegen sich bezüglich der Expression von ISG15, Mx1 und Stat1 keine relevante Veränderung zur Baseline feststellen ließ (Abbildungen 28A-C). Die Behandlung mit IFN α hingegen führte zu einer starken Induktion aller ISGs mit einer Zunahme der Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen um das 4- bis 112-Fache.

Im Vergleich dazu führte die HDV-1cc-Infektion im Gegensatz zu HDV-1p bereits zu einer starken ISG-Induktion zur Baseline. Bei ISG15, Mx1 und Stat1 fand sich hier eine relative Expression ungefähr in Höhe der IFN-induzierten ISG-Expression bei HDV-1p-Infektion (Abbildungen 28 A-C). Interessanterweise fiel die Expression dieser ISGs bis zum Ende des Versuches in den unbehandelten Kontrollen um das 4- bis 37-Fache ab, wohingegen die Expression unter IFN α -Behandlung etwa auf dem Niveau der Baseline erhalten blieb, aber auch kaum weiter anstieg. Im Vergleich zu den Kontrollen fand sich nach 14-tägiger Behandlung eine gesteigerte Induktion um 0,7-log bis 1,3-log (5- bis 19-fache Steigerung). Bei der Messung von CXCL10 in den HDV-1cc-infizierten Zellen zeigte sich zur Baseline

die stärkste Induktion im Vergleich zu HDV-1p. Die CXCL10-Expression fiel auch in den IFN α -behandelten Zellen deutlich ab, war aber um 0,7-log (5-fache Zunahme, Abbildung 28D) höher als in den unbehandelten Kontrollen.

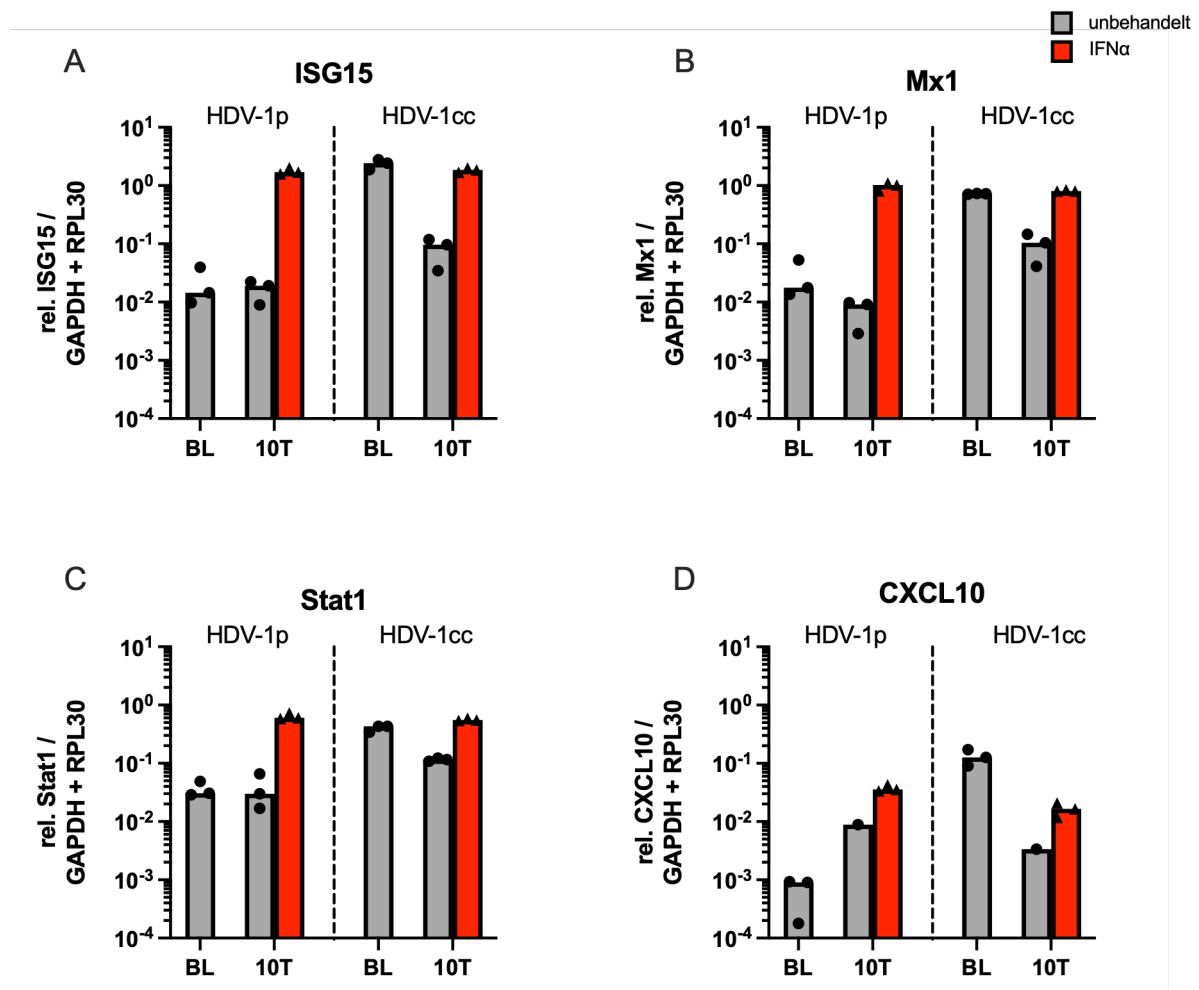


Abbildung 26: ISG-Expression in HDV-monoinfizierten PHHs nach IFN α -Gabe

Darstellung der relativen Expression von ISG15 (A), Mx1 (B), Stat1 (C) und CXCL10 (D) im Vergleich zu humanen Housekeeper-Genen nach 10 Tagen Behandlung mit IFN α (rot) oder unbehandelt (grau) in HDV-1p-infizierten (jeweils links) oder HDV-1cc-infizierten PHHs (jeweils rechts). BL = Baseline.

4.3.3 Kein Zellverlust durch IFN α

Sowohl die mikroskopisch dargestellte Zellmenge (Abbildung 29) als auch die Gesamtmenge an RNA in ng (Abbildung 30A) beziehungsweise das über die DNA messbare beta-Globin (Abbildungen 30B und 30C) blieben bis zum Ende des Versuches erhalten und machen einen Zelltod durch IFN α -Gabe äußerst unwahrscheinlich. Es kam sogar zu einer eher höheren beta-Globin-Menge in sowohl HDV-1p- als auch HDV-1cc-infizierten PHHs durch

IFN α (Abbildungen 30B und 30C). Bezüglich der RNA in ng zeigte sich bei HDV-1cc kein Unterschied zwischen unbehandelten Kontrollen und infizierten Zellen, wohingegen es bei HDV-1p-Infektion zu einem leichten Abfall um 0,3-log (51 %) in unbehandelten Zellen im Vergleich zur Baseline kam und die Menge durch IFN α erhalten werden konnte (Abbildung 30A).

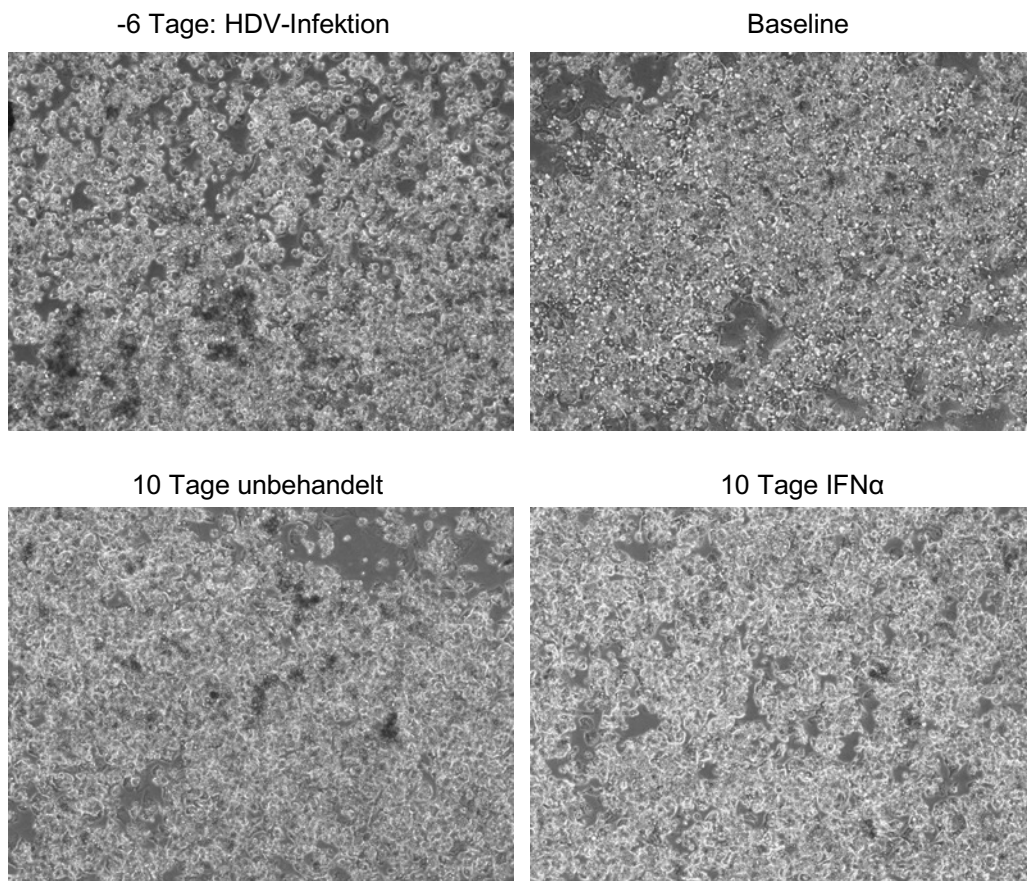


Abbildung 27: Lichtmikroskopie von HDV-monoinfizierten PHHs

Exemplarische Lichtmikroskopie von HDV-monoinfizierten PHHs unmittelbar vor HDV-Infektion (oben links), zur Baseline nach 6 Tagen (oben rechts), in einer unbehandelten Kontrolle nach 10 Tagen (unten links) und nach 10-tägiger IFN α -Behandlung (unten rechts).

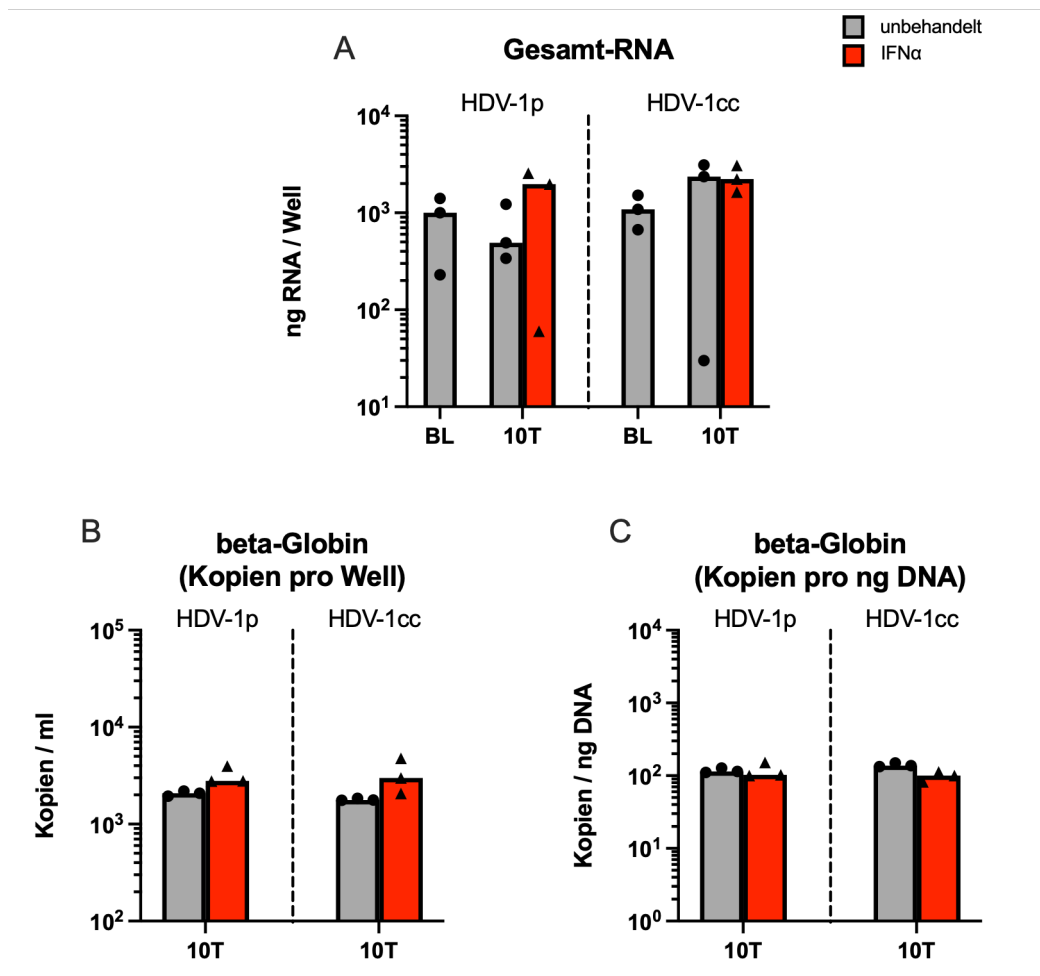


Abbildung 28: Zellzahl-Parameter in HDV-monoinfizierten PHHs nach IFNα-Gabe

Vergleich nach 10 Tagen IFNα-Behandlung (rot) mit unbehandelten Kontrollen (grau) bei HDV-1p-Monoinfektion (jeweils links) oder HDV-1cc-Monoinfektion (jeweils rechts). BL = Baseline. A) Gesamtmenge an RNA in ng pro Well. B) Absolute Anzahl an Kopien von intrazellulärem beta-Globin pro Well. C) Beta-Globin-Kopien pro ng DNA.

4.3.4 Abfall der NTCP-Expression bei HDV-Monoinfektion ohne Interferon-Therapie

Die relative NTCP-Expression fiel am Ende der Versuchszeitraumes im Vergleich zur Baseline, also im Zeitraum zwischen 10 und 16 Tagen nach HDV-Infektion, deutlich ab. Dieser Effekt machte sich in den HDV-1p-infizierten Zellen stärker bemerkbar (Reduktion um 2,0-log) als in den HDV1c-infizierten Zellen (Reduktion um 1,3-log). Zellen, die mit IFNα behandelt wurden, konnten die NTCP-Expression hingegen auf einem konstanten Niveau im Vergleich zur Baseline halten (Abbildung 31).

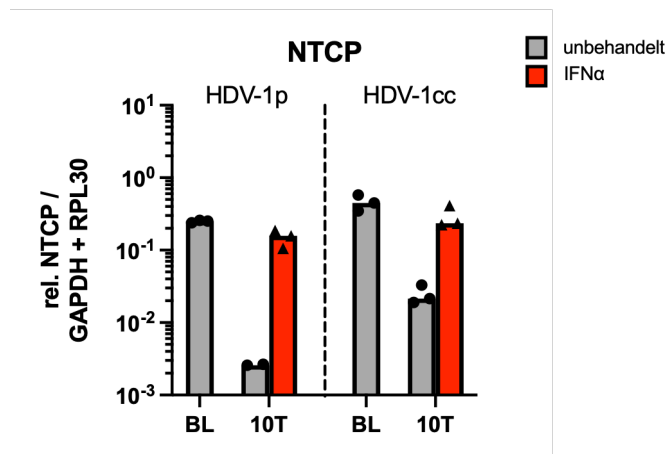


Abbildung 29: NTCP-Expression in HDV-monoinfizierten PHHs nach IFN α -Gabe

Relative Expression im Verhältnis zu humanen Haushaltsgenen in IFN α -behandelten PHHs (rot) und in unbehandelten Kontrollen (grau) zur Baseline (= BL) und nach 10 Tagen. Vergleich von HDV-1p-infizierten PHHs (links) und HDV-1cc-infizierten PHHs (rechts).

5. Diskussion

IFN α ist neben Bulevirtid derzeit das einzige Medikament, welches im klinischen Alltag zur Behandlung der chronischen Hepatitis D eingesetzt wird. Dabei tritt eine anhaltende Reduktion der Viruslast 24 Wochen nach Behandlungsende jedoch nur in etwa 29 % (17 % bis 47 %) aller mit IFN α -behandelten Patient:innen auf, von denen zudem mehr als 50% im Verlauf einen verzögerten HDV-Rückfall erleiden (Abdrakhman et al. 2021, Heidrich et al. 2014).

Zu den genauen Mechanismen, warum IFN α nur in so wenigen Individuen eine dauerhafte und langfristige Wirkung erreicht, finden sich derzeit keine klaren Antworten in der Literatur. In diversen Maus- und Zellkulturversuchen wurde immer wieder eine Resistenz gegenüber IFN α festgestellt (Chang et al. 2006, Chida et al. 2023, Han et al. 2011, Ilan et al. 1992, Lempp et al. 2019, McNair et al. 1994, Ye et al. 2019, Zhang et al. 2018). Diese Versuche wurden jedoch alle mit dem gleichen Virusstamm (HDV-1cc) durchgeführt, einem HDV-Genotyp 1, welcher ursprünglich zwar aus humanem Serum stammt, allerdings mehrfach seriell in Schimpansen übertragen wurde und letztlich aus einem HDV-infizierten Waldmurmeltier isoliert und sequenziert wurde (Kuo et al. 1988). Die genauen Wirkmechanismen von IFN α und umgekehrt der genaue Mechanismus bei IFN α -Resistenz sind derzeit nicht abschließend geklärt und vielfach diskutierter Gegenstand der aktuellen Literatur.

Als Vorarbeit dieser Dissertation wurde ein anderer Patienten-generierter Virusstamm, ebenfalls vom Genotyp 1 (HDV-1p), isoliert, sequenziert und kloniert sowie im Folgenden das Therapieansprechen auf IFN α für diesen Virusstamm in USG-Mäusen evaluiert und mit HDV-1cc verglichen (Giersch et al. 2021a, Hendricks 2022, Hermanussen 2021). Hierbei zeigte sich eine starke Reduktion der Viruslast bei HDV-1p, wohingegen HDV-1cc eine Resistenz gegenüber IFN α aufwies. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass die IFN α -Resistenz nicht für HDV im Allgemeinen gilt, sondern von bisher ungeklärten Determinanten abhängt, die das Genom des Virus betreffen (Hendricks 2022).

Um den neuen IFN α -sensiblen HDV-1p Virusstamm weiter zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit verschiedene Zellkulturexperimente durchgeführt. Hierfür wurde initial ein neues Zellkulturmodell mit PHHs, die bereits in vivo im Mausmodell mit HBV und teilweise auch HDV infiziert waren und dann isoliert wurden, generiert beziehungsweise ausgebaut. Im Anschluss folgte die Behandlung mit IFN α in vitro für bis zu zwei Wochen. Um zudem eine bessere Vergleichbarkeit mit den Zellkulturstudien, in denen sich eine IFN α -Resistenz gezeigt hatte, zu erzielen, wurde auch ein konventioneller PHH-Versuch mit kryokonservierten Zellen durchgeführt und das Ansprechen auf IFN α von HDV-1p und HDV-1cc miteinander verglichen.

5.1 Etablierung eines HDV-Modelles als Schnittstelle zwischen in vivo- und in vitro-Experimenten

Trotz der hohen Verfügbarkeit von Tumorzellen gelten primäre humane Hepatozyten heutzutage weiterhin als Goldstandard bezüglich hepatischer Zellkulturversuche. Dies liegt vor allem daran, dass eine intakte angeborene Immunantwort und andere hepatische Funktionen erhalten sind und PHHs somit das physiologischste Modell aller Zellkulturmodelle darstellen (Lee et al. 2023). Gleichzeitig bringen PHHs jedoch verschiedene Hürden mit sich, wie eine geringe Verfügbarkeit, den Verlust der hepatischen Differenzierung und vergleichsweise niedrige Infektionsraten (Lee et al. 2023). Um Letzteres zu umgehen, wurde in dieser Arbeit ein neues Zellkulturmodell genutzt, in dem humanisierte USG-Mäuse in vivo mit HBV oder HBV/HDV-1p infiziert wurden und PHHs nach einigen Wochen in stabilem Infektionszustand isoliert und in Zellkultur gebracht wurden. Durch die Messung von humanem beta-Globin, murinem beta-Actin und Bildung eines entsprechenden Quotienten konnte sichergestellt werden, dass zu über 99 % humane Hepatozyten in die Zellkultur gebracht wurden. Ein Teil der HBV-monoinfizierten Zellen wurde im Folgenden in vitro mit HDV-1p superinfiziert. Um bei der Superinfektion eine möglichst hohe Infektionsrate zu erzielen, fand eine Koinkubation mit Polyethylenglykol statt (Gripon et al. 1993). Anschließend erfolgte die Behandlung mit IFN α in vitro für bis zu 14 Tage, wobei eine Konzentration in Höhe von 1000 IU/ml gewählt wurde, die sich in verschiedenen Zellkulturversuchen mit HDV und HBV als Standarddosierung etabliert hat (Guo et al. 2019, Legrand et al. 2023, McNair et al. 1994, Wang et al. 2005). Das PHH-Modell wurde bereits zuvor für die Testung der IFN α -Antwort in HBV-infizierten PHHs in unserer Arbeitsgruppe getestet (Bockmann et al. 2021b) und in dieser Arbeit um in vivo koinfizierte PHHs ergänzt.

Um eine Dedifferenzierung der PHHs und somit veränderte Morphologie und Funktion der Zellen zu vermeiden, enthielt das Kulturmedium zusätzlich zu gängigen Substanzen wie Hormonen, Antibiotika und fetalem Kälberserum außerdem DMSO (Elaut et al. 2006). Die NTCP-Expression konnte so über den gesamten Versuchszeitraum weitestgehend konstant, wenn auch mit leichten Schwankungen bei IFN α -Gabe (siehe Abschnitt 4.3), erhalten werden. Auch eine Reaktion des angeborenen Immunsystems der Hepatozyten im Sinne einer intrinsischen Interferonantwort, objektiviert anhand der Messung unterschiedlicher ISGs, ließ sich beobachten. DMSO weist in hohen Konzentrationen zytotoxische Eigenschaften auf, wobei dies bei einem niedrigem Gehalt bis zu 2 % nicht beobachtet werden konnte (Sumida et al. 2011), weshalb in den Zellkulturen dieser Arbeit eine Konzentration von 1,8 % verwendet wurde. Zur Überprüfung eines Zellverlustes erfolgten zum einen regelmäßige mikroskopische Darstellungen aller Wells vor und nach den Mediumwechseln sowie Messungen des humanen beta-Globins und des Gesamt-RNA-Gehaltes pro Well.

Hierbei zeigte sich in der ersten Kultur mit in vivo koinfizierten PHHs eine allenfalls dezente Reduktion der Zellen bei IFN α -Behandlung, wohingegen sich bei der HDV-1p-Superinfektion konstante Level in allen Gruppen bis zum Ende des Versuches messen ließen. Auch mikroskopisch fanden sich bis zum Ende des Versuches, bei der sich die Zellen insgesamt 25 Tage in Kultur befunden hatten, keine vermehrten Lichtungen, sondern durchgehend eine straßenförmige Anordnung der Hepatozyten (Pflastersteinmuster) ohne Hinweise auf eine vermehrte Abheftung von Zellen. Ein Zellverlust kann über Bestimmung dieser eher ungenauen Parameter zwar nicht einwandfrei ausgeschlossen werden, scheint jedoch in Zusammenschau der Messungen und Mikroskopie eher unwahrscheinlich und ist daher als nicht relevant zu werten. Die Bestimmung eines Apoptosemarkers wie der Caspase-3 (Gómez-Lechón et al. 2002) wäre zur Sicherstellung aber möglicherweise sinnvoll und könnte zukünftig bei Verwendung des Zellkulturmodells ergänzt werden.

Bezüglich der Infektionsraten fand sich im ersten Versuchsaufbau mit HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs in vitro in den unbehandelten Kontrollen eine annähernd gleich hohe relative Menge an intrazellulärer HDV und HBV-RNA wie im Lebergewebe der entsprechenden USG-Maus. Die extrazelluläre Viruslast lag sowohl für HDV als auch HBV etwas unter der im Endserum der USG-Maus, war aber trotzdem hoch genug, um valide Aussagen über die Veränderungen durch IFN α -Gabe treffen zu können. Im zweiten Versuchsaufbau, in dem in vivo stabil HBV-infizierte PHHs isoliert und in vitro mit HDV-1p superinfiziert wurden, befand sich die Gesamtmenge an intrazellulärer HBV-RNA und DNA ebenfalls in einem ähnlichen Bereich wie in der entsprechenden Maus, wohingegen die Viruslast im Überstand etwa 2-log niedriger als im Endserum der Maus war. Durch die HDV-Superinfektion in vitro wurde eine relative HDV-RNA in etwa gleicher Höhe wie bei den koinfizierten Zellen erreicht. Die HBV-Infektionsraten scheinen im Vergleich zu ursprünglich genutzten herkömmlichen PHH-Versuchen, für die immer wieder das Problem einer niedrigen HBV-Suszeptibilität beschrieben wurde (Guo et al. 2023, Lee et al. 2023), in diesem Versuch somit vergleichbar zu in vivo Versuchen zu sein und zudem anhaltend stabil zu bleiben. Andererseits unterscheiden sie sich nicht wesentlich zu denen in optimierten PHH-Modellen der letzten Jahre, in denen beispielsweise durch Zugabe von DMSO und anderer Chemikalien für bis zu 24 Tage ähnlich hohe intra- und extrazelluläre HBV-Infektionsraten erreicht wurden (Han et al. 2021, Lucifora et al. 2020, Xiang et al. 2019). Stellt man zudem die extrazelluläre HBV-Viruslast im Überstand zwischen PHHs, welche in dieser Arbeit bereits in vivo mit HBV infiziert wurden, und PHHs, die ebenfalls aus humanisierten Mäusen isoliert, jedoch erst in vitro mit HBV infiziert wurden (Ishida et al. 2015), gegenüber, zeigen sich auch hier ähnlich hohe HBV-Mengen. Es sollte jedoch beachtet werden, dass es in der Studie von Ishida et al. zu einem anhaltenden HBV-Spreading über mindestens 32 Tage kam (ca. 2×10^7 HBV-

DNA-Kopien pro ml im Überstand), wohingegen die Isolation bereits in vivo HBV-monoinfizierter PHHs stabile Infektionswerte (nach 24 Tagen ca. 7×10^7 HBV-DNA-Kopien pro ml im Überstand) mit sich brachte. Bei Vergleich dieser Arbeit mit anderen PHH-Versuchen, in denen eine Ko- oder Superinfektion von HBV und HDV vorgenommen wurde, fällt insgesamt auf, dass in diesen weitestgehend deutlich höhere HDV-MOIs verwendet wurden. Während sich in dieser Arbeit bei Nutzung einer MOI von 1 zur HDV-Superinfektion nach 24 Tagen eine maximale intrazelluläre relative HDV-RNA-Menge von $3,7 \times 10^{-1}$ fand, konnte in einer anderen Studie bei HBV/HDV-Koinfektion mit einer HDV-MOI von 50 nach 13 Tagen eine intrazelluläre relative HDV-RNA-Menge von 10^1 bis 10^3 erreicht werden (Lucifora et al. 2023). Bei Nutzung von PHHs in Ko-Kultur mit nicht-parenchymalen Zellen lag die extrazelluläre HDV-RNA bei HBV/HDV-Ko- oder Superinfektion mit einer HDV-MOI von 1000 nach 28 Tagen bei etwa 10^6 bis 10^7 Kopien/ml, also in etwa vergleichbar zu der extrazellulären HDV-RNA nach 24 Tagen Superinfektion in den PHHs dieser Arbeit (Winer et al. 2020). Ob das Modell hinsichtlich der Infektionszahlen also einen wegweisenden Vorteil gegenüber anderen optimierten PHH-Zellkulturen bietet, bleibt aktuell fraglich. Hervorheben lässt sich jedoch, dass insbesondere bei der HBV/HDV-Koinfektion anhaltend stabile HBV- und HDV-Werte vorlagen und sich auch bei HBV-monoinfizierten Zellen eine stabile HBV-Menge fand. Zudem brauchte es im Vergleich zu anderen Studien eine wesentlich geringere HDV-MOI zum Erreichen einer hohen HDV-Viruslast.

Das neue HDV-Infektionsmodell bietet als Schnittstelle zwischen in vivo- und in vitro-Experimenten außerdem die Möglichkeit, Störfaktoren bei der Tierhaltung zu umgehen und unter kontrollierten Bedingungen präklinische Testungen von verschiedenen Substanzen bei hohen Infektionsraten vorzunehmen. Möglicherweise könnte es zukünftig auch zur Forschung mit anderen Hepatitisviren wie HCV oder HEV verwendet werden. Dabei liegt ein Vorteil insbesondere darin, die Effekte von HDV oder anderen Viren auf Zellebene im Rahmen einer stabilen Infektion in vitro untersuchen zu können, da herkömmliche PHHs in vitro normalerweise nur eine Lebensdauer von etwa 4 Wochen haben (Davidson und Khetani 2020) und eine chronische beziehungsweise stabile Infektion in vitro dadurch nur bedingt simulierbar ist. Da die HDV-Superinfektion jedoch in 90 % der Fälle in eine chronische Infektion übergeht (Negro und Lok 2023), wären insbesondere bei der Testung von Medikamenten möglichst realitätsnahe Rahmenbedingungen selbst in präklinischer Umgebung sinnvoll, wozu das neue Zellkulturmodell möglicherweise genutzt werden könnte. Gleichzeitig bietet sich das Modell auch für die Untersuchung der HDV-Infektionskinetiken unabhängig von einer Zellproliferation an, da sich PHHs in Zellkultur im Gegensatz zu den leicht verfügbaren hepatischen Tumorzellen in der Regel nicht weiter vermehren (Guo et al. 2023). Zudem unterstützt das Modell den gesamten HDV- und HBV-Lebenszyklus und könnte so zum

tieferen Verständnis der Interaktion zwischen Virus und Immunsystem und folglich zielgerichteter HDV-Behandlung beitragen.

Andererseits hat das Modell auch einige Nachteile und Limitationen, die es bei der zukünftigen Verwendung und zur Interpretation der generierten Ergebnisse dieser Arbeit zu berücksichtigen gilt. So ist es aufgrund der sequenziellen Kombination von Tier- und Zellkulturversuch sehr zeitaufwendig: Zum Zeitpunkt der Infektion waren die USG-Mäuse beide knapp 20 Wochen alt, gefolgt von einer Infektionsphase *in vivo* mit einer Dauer von 10 beziehungsweise 15 Wochen und einer *in vitro* Versuchsdauer von etwa 2 bis 3 Wochen, sodass die Versuche insgesamt eine Zeitspanne von über einem halben Jahr einnahmen. Daher erfordert das Modell eine gründliche und vorausschauende Planung und ist zur schnellen Generierung von Ergebnissen eher ungeeignet. Im Falle der *in vitro* durchgeführten HDV-1p-Superinfektion fiel zudem ein anhaltendes HDV-Spreading über mindestens 3 Wochen auf. Der im Vorfeld festgelegte Zeitpunkt von 10 Tagen als Baseline wurde somit zu früh gewählt und das eigentliche Ziel, den Effekt von IFN α auf stabil infizierte Zellen zu zeigen, verfehlt. Daher sollte vor erneuter Verwendung des Modells in einem Vorversuch ein geeigneter Zeitpunkt als Baseline evaluiert werden, ab dem es zu keinem Spreading mehr kommt. Die Kurve der Virämie stieg, wenn auch gegen Ende eher langsamer, bis 24 Tage nach Superinfektion an, sodass insbesondere dahinterliegende Zeitpunkte interessant sein könnten. Andererseits wäre es aber auch möglich, dass die PHHs eine so lange Dauer in Zellkultur nicht tolerieren, sodass das Setting der Superinfektion in Bezug auf das neue PHH-Modell potenziell nachrangig gegenüber der stabilen Koinfektion stehen könnte.

Eine technisch bedingte Barriere ergab sich im Rahmen der Isolation von humanen Hepatozyten aus der USG-Maus. Hierbei fanden sich nach manueller Auszählung im Vergleich zu vorherigen Arbeitsgruppen-internen Isolationen eher niedrige Vitalitätsquoten, sodass in beiden Experimenten gerade genug Zellen generiert wurden, um Triplikate zu allen Bedingungen bilden zu können. Bezüglich der Färbungen reichten die HBV-monoinfizierten Zellen nicht aus, um auch Kammerobjektträger mit ausreichend Zellen füllen zu können, sodass die visuelle Quantifizierung verschiedener viraler Marker über die Immunfluoreszenzfärbung nur bedingt erfolgen konnte. Eine mögliche Ursache dafür könnte zellulärer Stress ausgelöst durch eine Ischämie im Rahmen der Zellisolation und folglich Bildung von unter anderem reaktiven Sauerstoffspezies sein (Elaut et al. 2006) oder eine manuelle Schädigung der Zellen beim Ausstreichen der gelösten Hepatozyten aus der Leberkapsel. Auch eine zu lange Wartezeit bis zum anschließenden Ausplattieren der gelösten Zellen wäre als Ursache denkbar. In der späteren Überarbeitung des Protokolls konnten nach Verwendung einer anderen Kollagenase deutlich höhere Vitalitätsquoten erreicht werden. Potenzielle Nebenaktivitäten der ursprünglichen Kollagenase könnten also ebenfalls zu einer Zellschädigung geführt haben.

Die limitierte Zellzahl schränkt die Replizierbarkeit und statistische Verwertung der Ergebnisse ein, ohne dass eindeutig klar geworden ist, welcher Schritt bei der Isolation einer Optimierung bedarf. Die Prozedur der hepatischen Zellisolation sollte somit weiter überarbeitet und die einzelnen Schritte genauer auf ihre Effektivität überprüft werden. In Bezug auf die Immunantwort im Rahmen der HDV-Infektion ist das Modell aufgrund der Abwesenheit einer adaptiven Immunantwort ebenfalls nur eingeschränkt sinnvoll, wobei dies auch in Standard-PHH-Kulturen der Fall ist und somit keinen direkten Nachteil darstellt. Gleiches gilt für die Tendenz zur Dedifferenzierung, die in PHH-Kulturen allgemein gegeben ist (Lee et al. 2023) und die in diesem Fall scheinbar gut über die Gabe mit DMSO beschränkt werden konnte.

Zusammenfassend bringt das neue Zellkulturmodell insbesondere den großen Vorteil einer hohen Infektionsrate mit sich und erlaubt die Untersuchung von HDV-Infektionsmarkern in stabil infizierten PHHs. Es benötigt jedoch eine lange Versuchsdauer und ist technisch anspruchsvoll. Vor erneuter Nutzung sollten die technischen Schwierigkeiten möglichst ausgeräumt werden, um eine bessere Replizierbarkeit der Ergebnisse und Verlässlichkeit für zukünftige Zellkulturversuche zu erreichen.

5.2 Charakterisierung eines neuen HDV-Virusstammes: Ansprechen von HDV-1p auf IFN α in vitro und Vergleich mit HDV-1cc

In verschiedenen Quellen der letzten Jahrzehnte wurde immer wieder eine Resistenz von HDV gegenüber IFN α in vitro festgestellt (Chang et al. 2006, Han et al. 2011, Ilan et al. 1992, Lempp et al. 2019, McNair et al. 1994, Zhang et al. 2018). Wie bereits erläutert wurde hierfür jedoch immer der gleiche Virusstamm vom Genotyp 1, in dieser Arbeit HDV-1cc genannt, verwendet. 2017 stellten Giersch et. al hingegen ein starkes Ansprechen auf peg-IFN α in vivo fest. Hierbei wurden Leber-chimäre USG-Mäuse mit einem Virusstamm aus dem Serum eines HDV-infizierten Patienten infiziert (in dieser Arbeit HDV-1p genannt), welcher später eine anhaltende IFN α -induzierte Virussuppression erreichte. Die 4-wöchige peg-IFN α -Behandlung der Mäuse erzielte eine Reduktion der HDV-Virämie um 1,4-log (Giersch et al. 2017). Daraufhin wurde der Virusstamm sequenziert und kloniert und es wurden neue infektiöse virale Partikel in Zellkultur generiert (Giersch et al. 2023, 2021a). Danach erfolgte erneut die Testung dieser infektiösen viralen Partikel auf das Ansprechen auf peg-IFN α in vivo und auch hier ließ sich eine Reduktion aller HDV-Parameter erreichen (Giersch et al. 2023). Bei Vergleich mit dem herkömmlich genutzten Virusstamm HDV-1cc wurde für diesen Stamm die Resistenz bestätigt und stand somit im Kontrast zu HDV-1p. Dies legte die Hypothese nahe, dass das Ansprechen auf IFN α Virusstamm-abhängig ist

und möglicherweise Faktoren oder Sequenzen des Genoms eine Rolle dabei spielen (Hendricks 2022). Ein abschließender Vergleich der Sequenzen von IFN α -resistenten und IFN α -sensiblen Virenstämmen steht derzeit noch aus, könnte aber entscheidende Informationen über den Ursprung des Therapieansprechens mit sich bringen. Denkbar wäre in der Konsequenz auch eine individuelle Therapieanpassung, abgestimmt auf das Genom des Virus, mit dem ein Patient oder eine Patientin infiziert ist (Hendricks 2022).

Um den neuen HDV-1p-Virusstamm weiter zu charakterisieren und eine Vergleichbarkeit mit den Vorstudien, die eine IFN α -Resistenz von HDV-1cc ergeben hatten, zu erzielen, wurde in dieser Arbeit zunächst das Ansprechen von HDV-1p auf IFN α in vitro getestet und ein Vergleich viraler HBV- und HDV-Marker mit unbehandelten Kontrollen vorgenommen. Dafür wurde initial das oben beschriebene, teilweise neue Zellkulturmodell verwendet, in dem in vivo stabil HBV- oder HBV/HDV-1p-infizierte PHHs isoliert, dann im Falle der HBV-Monoinfektion in vitro mit HDV-1p superinfiziert und schließlich für bis zu 14 Tage mit IFN α behandelt wurden. Im Anschluss und um eine bessere Vergleichbarkeit mit den zuvor durchgeführten Zellkulturversuchen zu erreichen, in denen HDV sich immer wieder resistent gezeigt hatte, wurde die Zellkulturreihe um einen herkömmlichen PHH-Versuch mit kryokonservierten Zellen ergänzt und das Ansprechen von HDV-1p auf IFN α direkt mit dem von HDV-1cc verglichen.

5.2.1 Einfluss von IFN α -Behandlung in vitro auf HDV-1p-Viruslast

In stabil in vivo HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs konnte die Behandlung mit IFN α in vitro die Viruslast der HDV-RNA nach 14 Tagen intrazellulär um 1,6-log (98 %) und extrazellulär um 0,7-log (81 %) reduzieren und den Anteil HDAg-positiver Hepatozyten erheblich verringern. Außerdem kam es zu einem leichten IFN α -induzierten Abfall der HBV-RNA und einer Reduktion der HBV-DNA und des HBsAg im Zellkulturüberstand. Gleichzeitig fielen jedoch auch die HBV-Parameter nach 14 Tagen in den unbehandelten Kontrollen etwas ab. Dies könnte auf die häufig beobachtete HDV-induzierte Suppression der HBV-Replikation (Chida et al. 2023, Giersch und Dandri 2015) bei gleichzeitiger HBV/HDV-Ko- und HDV-Superinfektion zurückzuführen sein, die möglicherweise mit der allgemein gesteigerten ISG-Induktion bei HBV/HDV-Infektion im Vergleich zur HBV-Monoinfektion (Giersch et al. 2015) zusammenhängt. Dies würde zu der Beobachtung passen, dass auch HDV-1p eine starke intrinsische Antwort des angeborenen Immunsystems im Sinne einer ISG-Induktion verursacht und somit ebenfalls eine gesteigerte Antigenpräsentation von HBV-Epitopen in PHHs auslösen könnte, wie es zuvor in PHHs zu beobachten war (Tham et al. 2020).

Bei den in vitro mit HDV-1p superinfizierten stabil HBV-infizierten PHHs konnte die HDV-Ausbreitung sowohl intra- als auch extrazellulär durch IFN α ebenfalls deutlich eingeschränkt werden, sodass sich nach 14 Tagen Behandlung eine um 0,9-log (87 %) niedrigere Menge HDV-RNA fand. Allerdings kam es bis zum Ende des Versuches zu einem Spreading der HDV-Virämie und ein sogenannter *steady state*, also eine stabile HDV-RNA-Menge, wurde bis zum Ende des Versuches nicht erreicht. Während in den koinfizierten Zellen die HBV-DNA nicht eindeutig beeinflusst wurde, fiel hier eine klare Reduktion aller HBV-Parameter sowohl intrazellulär als auch im Überstand auf. Interessanterweise stellte sich dieses Mal bezüglich der HDV-Viruslast kein relevanter Unterschied zwischen den 14 Tage lang behandelten HBV- und den HBV/HDV-1p-infizierten Zellen ein und in beiden Gruppen kam es im Vergleich zur Baseline zu einem leichten Abfall der HBV-Parameter, sodass hier von keiner HDV-induzierten HBV-Suppression auszugehen ist. Dies steht im Kontrast zu der Beobachtung von Bockmann et. al (Bockmann et al. 2021b), die im gleichen Zellkulturmodell (PHH-Isolation aus in vivo HBV-infizierter USG-Maus und anschließende HDV-Superinfektion in vitro) einen starken Abfall der intrazellulären HBV-pgRNA bei gleichzeitig hoher HDV-RNA nach Superinfektion feststellten. Somit ist nicht klar, wie aussagekräftig die Daten bezüglich der HBV-Suppression sind, was somit Fokus in weiteren Untersuchungen sein sollte.

Entgegen der Erwartung, HDV-1p würde auch im Rahmen einer Monoinfektion gut auf IFN α ansprechen, konnte im letzten Versuchsaufbau in Abwesenheit von HBV keine wirklich relevante IFN α -induzierte Suppression der HDV-RNA festgestellt werden. Es kam zwar zu einer sehr geringen Reduktion der HDV-RNA um 0,1-log bei Behandlung von HDV-1p infizierten PHHs, im Vergleich zu der starken Reduktion in den ko- und superinfizierten Zellen scheint dieser Wert jedoch eher vernachlässigbar. Es sollte zudem berücksichtigt werden, dass die Triplikate der HDV-1p-Kontrollgruppe sehr weit auseinander lagen und somit nur bedingt aussagekräftig sind. Interessanterweise kam es aber in den HDV-1cc-infizierten Zellen zu einer sogar höheren Viruslast in den behandelten Zellen. Es scheint also auch im Rahmen der Monoinfektion im direkten Vergleich beider Virenstämme immerhin die Tendenz zu geben, dass IFN α einen leichten Effekt auf HDV-1p hat, wohingegen HDV-1cc vollständig resistent zu sein scheint. Möglicherweise erzielt IFN α im Allgemeinen nur eine sehr schwache Wirkung in Zellkultur in der Abwesenheit von HBV, sodass vielleicht auch die unterliegende Infektion mit dem Helfervirus eine Rolle spielt. Die allgemein niedrigen Infektionsraten in PHHs sind in diesem Versuch jedoch eher nicht die Ursache des lediglich geringen Ansprechens, denn hier lag die intrazelluläre HDV-RNA im selben Bereich wie bei den zuvor durchgeführten Versuchen mit in vivo stabil infizierten PHHs. Eine unterschiedliche Infektiosität beider Viren scheint ebenfalls unwahrscheinlich, da bei gleicher MOI für

beide Virenstämme am Ende des Versuches auch vergleichbare intrazelluläre Virusmengen nachgewiesen werden konnten.

5.2.2 IFN α -induzierter Zelltod unwahrscheinlich als Ursache für Virusreduktion bei HDV-1p-Infektion

Zuvor konnte in humanisierten Mäusen bei peg-IFN α -Behandlung, unabhängig vom HDV-Virusstamm, eine Induktion der humanen Caspase 8 festgestellt werden (Hermanussen 2021). Die Caspase ist ein Apoptosemarker, der an verschiedenen Entzündungsprozessen und der Immunantwort beteiligt ist (Orning und Lien 2021), sodass von einem leichten IFN α -getriggerten Hepatozytenverlust in vivo ausgegangen wurde (Hermanussen 2021). Zudem kann auch eine ausgeprägte HDV-Replikation zu einer Abheftung von Zellen in Zellkultur und Zelltod führen (Chad et al. 1990) und in den hier durchgeführten Zellkulturversuchen kam es zu mit in vivo vergleichbaren Virusmengen. Es wäre also möglich, die beobachtete HDV-Reduktion in dieser Arbeit im Kontext der Ko- und Superinfektion fälschlicherweise aufgrund eines IFN α -induzierten Zellverlustes oder allgemeinen zellulären Stress bei verhältnismäßig eher langer Verweildauer der PHHs (bis zu 24 Tage) in Zellkulturbedingungen beziehungsweise aufgrund einer durch eine hohe Menge an HDV-RNA getriggerten Zellabheftung fehlzuinterpretieren.

Um dies zu überprüfen, wurden verschiedene Parameter zur orientierenden Einschätzung der Zellzahl pro Well evaluiert. Die Gesamtmenge an RNA und die Anzahl der Kopien des humanen beta-Globins, welches als Marker für humane Zellen genutzt wird (Giersch et al. 2017), zeigten dabei keine eindeutige Tendenz hinsichtlich eines Zellverlustes. Während sich bei der RNA eine, wenn auch sehr dezente, Reduktion durch IFN α in koinfizierten PHHs einstellte, zeigte sich bei der HDV-1p-Superinfektion kein relevanter Abfall. Bei der HDV-1p-Monoinfektion kam es eher zu einem Erhalt der Gesamt-RNA durch Behandlung und einer im Vergleich dazu niedrigeren Menge in den unbehandelten Kontrollen, wohingegen es bei der HDV-1cc-Infektion keinen Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen gab. Letzteres wäre zwar in der Tat eine Erklärung für das unterschiedliche IFN-Ansprechen der beiden Virenstämme, jedoch kam es ausgerechnet in dem Versuchsaufbau der HDV-Monoinfektion zu keinem relevanten HDV-Verlust, sodass diese Theorie noch einmal genauer untersucht werden müsste. Die Kopienzahl des humanen beta-Globins nach IFN α -Behandlung schien sich sowohl in ko- als auch superinfizierten PHHs nicht wesentlich durch IFN α -Gabe zu verändern und blieb auf einem weitgehend konstanten Niveau, wobei sich bei der HDV-Monoinfektion höhere beta-Globin-Kopien nach IFN α -Gabe fanden. Da bei der Monoinfektion jedoch in Bezug auf die beta-Globin-Expression keine

Ausgangswerte zum Vergleich der Daten nach Behandlung zum Zustand vor Beginn der Behandlung vorliegen, ist es schwierig, diese Daten genauer einzuordnen und fraglich, inwiefern sich IFN α auf die Zellmenge bei HDV-Monoinfektion auswirkt. Ein eindeutiger Erklärungsansatz dafür ließ sich in der Literatur bislang nicht finden. Ebenso gab es keine klaren Hinweise, dass ein methodisches Vorgehen ursächlich für diese Abweichung sein könnte.

Eine auf den in dieser Arbeit durchgeführten Experimente aufbauende Versuchsreihe, ausgeführt von Jonathan Kolbe, wiederholte den ersten Zellkulturversuch mit stabil in vivo HBV/HDV-1cc koinfizierten PHHs zu exakt denselben Versuchsbedingungen. Hierbei fiel ebenfalls ein allenfalls dezenter RNA-Verlust bei IFN α -Behandlung auf, jedoch kam es zu keiner Reduktion der HDV-RNA (Giersch et al. 2023). Da sich somit in beiden Versuchen, also sowohl bei HDV-1p- als auch HDV-1cc-Koinfektion, ein leichter RNA-Verlust beobachten ließ, jedoch trotzdem ein unterschiedliches Ansprechen auf die Therapie vorlag, scheint ein Zelltod als Erklärung für die HDV-Reduktion bei HDV-1p-Infektion in Zusammenschau der Befunde unwahrscheinlich. Zur genaueren Evaluierung des Ausmaßes eines potenziellen Zelltodes ist die Bestimmung eines Apoptosemarkers in weiteren Untersuchungen sinnvoll.

5.2.3 HDV-1p vermittelte Immunreaktion wird durch IFN α verstärkt

Im Rahmen der angeborenen Immunantwort zur Abwehr viraler Infektionen kommt es zur Induktion verschiedener Interferon-stimulierter Gene, die wiederum für die Bekämpfung der Virusinfektion eine wichtige Rolle spielen (Schoggins 2014). Neben der Hemmung des Viruseintritts in die Zelle können sie beispielsweise den Transport zum Zellkern oder die virale Genexpression inhibieren (Schoggins 2019). Während die exakten Abläufe der Immunreaktion beziehungsweise exakten Mechanismen der Viruselimination durch das Immunsystem und die Interaktion von Immunantwort und Virusreplikation im Kontext der HDV-Infektion nicht abschließend geklärt sind, ist aktuell immerhin bekannt, dass HDV eine starke Interferonantwort des angeborenen Immunsystems mit folglich starker intrinsischer ISG-Induktion auslöst (Giersch et al. 2015, Jung et al. 2020b, Zhang et al. 2018, Zhang und Urban 2021).

Die in dieser Arbeit untersuchten ISGs umfassen ISG15, Mx1, Stat1 und CXCL10. Bei allen kam es zu einer sowohl HDV-vermittelten als auch IFN α -vermittelten Steigerung der Induktion auf RNA-Ebene. Die intrinsische ISG-Expression des angeborenen Immunsystems der PHHs wurde dabei zusätzlich fast ausnahmslos durch IFN α gesteigert und trat unabhängig

vom Infektionstyp auf, sodass es keine Rolle spielte, ob eine Ko-, Super- oder Monoinfektion vorlag. Dabei kam es im Falle der Ko- und Superinfektion zwischen dem 7. und 14. Tag der IFN α -Behandlung auch in den unbehandelten Kontrollen noch zu einem Anstieg der Expression, sodass eine anhaltende IFN-Reaktion vorhanden zu sein scheint. Die IFN α -Gabe wiederum schien bereits innerhalb der ersten 7 Tage der Behandlung die ISG-Induktion bis zum Maximum anzutreiben. Eine weitere Steigerung der Expression nach dem 7. Behandlungstag blieb aus, die ISGs wurden jedoch auf einem konstanten Niveau erhalten. Im Vergleich dazu trat bei HBV-monoinfizierten PHHs in Abwesenheit von HDV keine relevante Steigerung der ISG-Induktion allein durch HBV ein, sondern erst nach Verabreichung von IFN α . Dies deckt sich mit vorherigen Beobachtungen, bei denen HDV zu einer anhaltenden Antwort des angeborenen Immunsystems und somit intrinsischen ISG-Induktion führt, wohingegen diese Reaktion bei HBV größtenteils ausbleibt oder nur schwach vorhanden ist (Chida et al. 2023, Giersch et al. 2015, Zhang und Urban 2021). In humanisierten Mäusen erreichte diese gesteigerte HDV-induzierte ISG-Induktion ihren Höhepunkt nach etwa 8 Wochen und blieb für insgesamt mindestens 12 Wochen erhalten (Giersch et al. 2015).

Die einzige Ausnahme, die nicht dem sonst durchweg beobachteten Muster der ISG-Induktion folgte, stellte die CXCL10-Induktion in koinfizierten PHHs dar. Auffällig war hier, dass bei der CXCL10-Messung in koinfizierten PHHs auch nach Wiederholung der Messung die Expression nach 14 Tagen in unbehandelten Kontrollen etwas höher war als nach IFN α -behandelten Zellen war, was im Widerspruch zu den CXCL10-Messungen in super- und monoinfizierten PHHs steht. Hierbei könnte einerseits ein technisches Problem in Bezug auf die CXCL10-Primer/Sondenkombination vorgelegen haben, sodass diese vor erneuter Nutzung überprüft werden sollte. Andererseits wäre auch denkbar, dass durch eine Reduktion der HDV-RNA eine geringere CXCL10-Expression zustande kommt. CXCL10 ist ein pro-inflammatorisches und pro-fibrinogenes Chemokin (Hintermann et al. 2010) und geht in Schimpansen mit erhöhten ALT-Spiegeln und einer hepatischen Nekroinflammation einher (Engle et al. 2020). Zudem ist bekannt, dass hohe HDV-RNA-Spiegel mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Leberzirrhose einhergehen (Romeo et al. 2014), die im Rahmen der HDV-Infektion als Folge einer chronischen Entzündung entsteht (Altstetter et al. 2021). Sowohl niedrige CXCL10-Spiegel als auch niedrige HDV-RNA-Mengen scheinen also mit einem geringeren Entzündungsgrad einherzugehen, sodass diese Ergebnisse möglicherweise korrelieren könnten. Denkbar ist daher, dass die starke Reduktion der HDV-RNA nach 14 Tagen IFN α -Behandlung zu einer allgemein reduzierten hepatischen Entzündungsreaktion führt und somit eine niedrigere CXCL10-Expression nach sich zieht, auch wenn dies aufgrund der Abweichung lediglich im Rahmen der Koinfektion, nicht jedoch bei HDV-1p-Superinfektion, als eher unwahrscheinlich einzustufen ist. Ergänzend

hätte die Bestimmung anderer stark pro-fibrinogener Zytokine wie TNF α (Yang und Seki 2015) oder die Messung der Aminotransferasen sinnvoll sein können, die in HDV-infizierten Patient:innen bekanntermaßen korrelieren (Joshi et al. 2023). Eine ALT-Messung wurde im Rahmen dieser Arbeit initial vorgenommen (Daten nicht abgebildet), jedoch fielen die Messungen vermutlich aufgrund der vergleichsweise geringen Zellzahl und somit ohnehin geringen Menge an ALT und AST im Zellkulturüberstand im Vergleich zum Serum bei Patient:innen sehr schwankend aus oder waren teilweise gar nicht messbar, sodass hierzu vor erneuter Messung eine andere Methode gewählt oder gar entwickelt werden sollte. Sollte es gelingen, eine ALT-Messung in PHHs in vitro vorzunehmen, könnte möglicherweise eine Korrelation der verschiedenen ISGs mit dem Grad der hepatischen Entzündung beziehungsweise Auswirkung dieser Entzündung auf die Hepatozyten-Morphologie hergestellt werden.

Neben den konventionellen ISG-Messungen erfolgte zudem eine mittels Immunfluoreszenzfärbung durchgeführte HLA-Visualisierung in koinfizierten PHHs. Diese erweckte - passend zu den vorherigen Ergebnissen - den Eindruck einer gesteigerten HLA-Präsenz einerseits durch HDV an sich und andererseits einer weiteren Zunahme durch IFN α . Bei genauerer Betrachtung fällt zudem auf, dass möglicherweise insbesondere HDAg-negative Zellen vermehrt HLA exprimieren, da in diesen das fluoreszierende Signal stärker vorhanden zu sein scheint. Dies passt zu der Beobachtung von Giersch et. al, dass Stat1 ebenfalls am ehesten in HDAg-negativen Hepatozyten akkumuliert und bei höherer Menge an intrazellulärem HDAG möglicherweise bestimmte intrazelluläre Interferenzmechanismen des Immunsystems greifen (Giersch et al. 2015). Ähnliches könnte also auch für andere ISGs wie das an der Antigenpräsentation beteiligte HLA gelten, welches auch in anderen Studien im Vergleich zur HBV-Infektion bei gleichzeitiger Präsenz von HDV deutlich verstärkt exprimiert wurde und wie bereits erwähnt auch eine Erklärung für die HBV-Suppression bei gleichzeitig vorliegender HDV-Infektion durch eine gesteigerte Antigenpräsentation von HBV-Epitopen wäre (Tham et al. 2020). Da sich in PHH-Versuchen allerdings nur das angeborene Immunsystem, nicht jedoch eine adaptive Immunantwort widerspiegelt, lässt sich dies in dieser Arbeit nicht weiter überprüfen.

5.2.4 Zusammenfassender Vergleich von HDV-1p und HDV-1cc

Zum Vergleich der HDV-1p- und HDV-1cc-Infektion wurde in dieser Arbeit jeweils eine Monoinfektion mit einem der beiden Virenstämme in kryokonservierten PHHs etabliert. Aufgrund eines technischen Fehlers bei der intrazellulären RNA-Isolation konnten zur Baseline, also 6 Tage nach Infektion der Zellen, keine Messungen der HDV-RNA durchgeführt werden und es stehen zur Interpretation der Ergebnisse lediglich die Daten nach 10-tägiger

IFN α -Behandlung beziehungsweise zum Vergleich die jeweiligen unbehandelten Kontrollen zur Verfügung. Es ist somit unklar, ob und inwiefern sich die Viruslast unterschiedlich schnell entwickelt hat, was die Auswertung des Versuches geringfügig einschränkt. Nach 10 Tagen fand sich jedoch eine annähernd gleich hohe HDV-Expression in HDV-1cc- und HDV-1p-infizierten PHHs, sodass von einer ähnlich hohen Infektiosität beider Virenstämme ausgegangen werden kann und dies somit als Erklärungsansatz eines unterschiedlichen Ansprechens auf IFN α , wie es sich zuvor in Mäusen gezeigt hatte (Giersch et al. 2017), wegfällt. Wie bereits beschrieben kam es lediglich bei HDV-1p-infizierten Zellen zu einer minimalen Reduktion der HDV-RNA durch IFN α -Behandlung, während ein Effekt in HDV-1cc-infizierten PHHs vollständig ausblieb. Die Daten sind zwar nicht signifikant und aufgrund einer großen Streubreite nur bedingt aussagekräftig, würde aber zu den Ergebnissen der beiden Vorversuche mit ko- und superinfizierten PHHs passen. Auch die spätere Wiederholung des Versuches mit HBV/HDV-koinfizierten Zellen durch Jonathan Kolbe, welcher in diesem Fall den Versuchsaufbau mit HDV-1cc-infizierten Hepatozyten durchführte, zeigte im Vergleich zur HDV-1p-Infektion kein Ansprechen von HDV-1cc auf IFN α (Giersch et al. 2023). Warum also ein Effekt von IFN α im Setting der HDV-Monoinfektion ausgeblieben ist, bleibt unklar und kann einerseits an der Monoinfektion an sich liegen, die im Menschen physiologischerweise nicht vorkommt (Smedile et al. 1982), andererseits wären auch technisch bedingte Ursachen möglich.

Bei Vergleich der ISG-Expression zwischen der HDV-1p und HDV-1cc-Monoinfektion fiel interessanterweise eine höhere intrinsische Induktion in HDV-1cc-infizierten Zellen bereits zu Beginn des Versuches (Baseline) auf. Dies steht im Kontrast dazu, dass HDV-1cc dennoch IFN α -resistent zu sein scheint. Es kommt also zur verstärkten ISG-Induktion, ohne dass diese ISGs einen Effekt in Bezug auf die HDV-RNA zu vermitteln scheinen. Somit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass nicht die Interferonantwort mit ISG-Induktion per se verantwortlich für die IFN α -Resistenz ist, sondern dass HDV-1cc vermittelte Mechanismen, die erst an Prozessen nach der ISG-Induktion beteiligt sind, für die fehlende Virussuppression zuständig sein könnten. Eine andere Erklärung könnte auf eine Beobachtung von Palatini et al. zurückzuführen sein, die bei Vergleich von HDV-1cc und einem HDV-WHO-Virusstamm feststellten, dass HDV-1cc in HepG2-Zellen eine IFITM3-unabhängige Infektion hervorruft (Palatini et al. 2022). IFITM3 dient als Interferon-induziertes Transmembranprotein als NTCP-Kofaktor und könnte von HDV, genauso wie es einige andere Viren tun, möglicherweise zur Verhinderung einer intrazellulären viralen Zerstörung durch das Immunsystem zweckentfremdet werden (Palatini et al. 2022). Ein Knockout von IFITM3 führte dabei zu einer Reduktion der Infektionsraten bei Nutzung des WHO-Virusstamms, wohingegen dies keinen Einfluss auf die HDV-1cc-Infektion hatte (Palatini et al. 2022). Somit ist denkbar, dass exogen verabreichtes IFN α normalerweise ebenfalls einen Einfluss auf die IFITM3-

Expression haben könnte und HDV-1cc dieses Phänomen durch derzeit unbekannte Mechanismen umgeht. Ob und inwiefern auch die Infektion mit HDV-1p IFITM3-abhängig verläuft, wäre daher eine interessante Fragestellung zur zukünftigen weiteren Charakterisierung von HDV-1p und könnte möglicherweise einen Erklärungsansatz in Bezug auf virale Unterschiede liefern, die wiederum das unterschiedliche Ansprechen auf IFN α erklären könnten. Auch der abschließende Vergleich der Sequenzen von HDV-1cc und HDV-1p könnte weitere Erkenntnisse generieren, steht aber derzeit noch aus. Zudem wäre es sinnvoll, mehr ISGs zu analysieren und mögliche Unterschiede der Virenstämme bei der Induktion verschiedener ISGs aufzudecken.

5.3 Einfluss von IFN α auf die NTCP-Expression

NTCP wurde 2012 als zugehöriger Rezeptor für HBV und HDV identifiziert (Yan et al. 2012) und ist seitdem immer wieder von hohem Interesse in der medizinischen Forschung gewesen. Einerseits dient die Identifizierung des Rezeptors einem besseren Verständnis des Lebenszyklus von HBV und HDV und ermöglicht zum Beispiel den Einsatz von entsprechend modifizierten Tumorzellen, andererseits hilft sie bei der Entwicklung neuer Therapien (Heuschkel et al. 2021, Yan et al. 2012). Bereits 2020 wurde in Europa das erste HDV-spezifische Medikament zugelassen, Bulevirtid, welches als Entry-Inhibitor eine kompetitive NTCP-Hemmung erzeugt und so eine Verbreitung von HDV verhindert (EMA 2024). Derzeit wird es in den Leitlinien der AASLD, EASL und DGVS zur Behandlung der chronischen Hepatitis D auch in Kombination mit einem NUC oder IFN α empfohlen.

Allgemein wird die NTCP-Expression von der vorhandenen Gallensäurekonzentration und von verschiedenen Hormonen beeinflusst, und auch die Ausschüttung von Zytokinen wie TNF α oder verschiedenen Interleukinen führt zu einer Downregulation des Rezeptors in Nagetieren über Hemmung des Transkriptionsfaktors HNF4 α (englisch: *hepatocyte nuclear factor 4 alpha*) (Appelman et al. 2021). In der Folge führt beispielsweise Interleukin-6 zu einer deutlichen Reduktion des HBV-Eintritts in die Zelle über Reduktion der NTCP-Expression (Bouezzedine et al. 2015). Auch der Verlust der hepatozytären Dedifferenzierung in Zellkultur und die Proliferation von PHHs geht mit einer NTCP-Downregulation und möglicherweise Translokation des Rezeptors in das Zytoplasma des Hepatozyten einher, was ihn als HBV-Eintrittsrezeptor untauglich macht, und trägt so zur Bekämpfung einer HBV-Infektion bei (Yan et al. 2019). Auch bei HBV-infizierten Patient:innen wurde eine NTCP-Downregulation bei besonders starker histologisch nachgewiesener Entzündung und somit kompensatorischer Leberzellproliferation beobachtet (Yan et al. 2019), wohingegen bei

anderen Lebererkrankungen wie der nicht-alkoholischen Steatohepatitis oder primärer biliärer Cholangitis im Endstadium NTCP hochreguliert wird (Zhao et al. 2021).

Zu der Frage ob und falls ja inwiefern die Expression von NTCP durch eine HDV-Infektion an sich oder die Behandlung mit IFN α beeinflusst wird, findet sich in der Literatur aktuell keine Studie, die diese Fragestellung hinreichend beantwortet. Während Allweiss et al. keinen Unterschied der NTCP-Expression in HDV-infizierten Patient:innen nach Bulevirtid- und NUC-Behandlung finden konnten (Allweiss et al. 2024), stellten Giersch et al. eine Reduktion der Expression um das 3- bis 4-Fache durch IFN α -Therapie in HDV-infizierten USG-Mäusen fest (Giersch et al. 2023).

In dieser Arbeit wurden bezüglich der NTCP-Expression nicht ganz eindeutige Daten erhoben. Während es in HDV-1p-superinfizierten und der HDV-monoinfizierten PHHs jeweils zu einem Erhalt der NTCP-Expression auf Ausgangsniveau durch IFN α -Behandlung und umgekehrt zu einem Abfall der Expression in den unbehandelten Zellen kam, fand sich in koinfizierten Zellen eine Reduktion der Expression durch IFN α . Trotz unterschiedlicher Tendenzen kam es also in allen Versuchen zu einer Veränderung der Expression durch IFN α . Inwiefern IFN α auch bei Patient:innen eine Veränderung der NTCP-Expression erzeugt, ist in der gegenwärtigen Literatur nicht dokumentiert, wäre aber denkbar und würde dazu passen, dass NTCP von pro-inflammatorischen Zytokinen herunterreguliert wird (Le Vee et al. 2009), die wiederum im Rahmen der HDV-Infektion durch IFN α verstärkt induziert werden (Giersch et al. 2017). Zum synergistischen Effekt bei der kombinierten Behandlung mit IFN α und Bulevirtid (Asselah und Rizzetto 2023), die gemeinsam eine höhere Reduktion der HDV-RNA erreichen (Asselah et al. 2021, Bogomolov et al. 2016, De Ledinghen et al. 2021, Lampertico et al. 2022), könnte die Reduktion der NTCP-Expression ebenfalls beitragen. Falls also IFN α NTCP in HDV-infizierten Hepatozyten wirklich herunterreguliert, käme dies dem Wirkmechanismus von Bulevirtid als NTCP-Inhibitor und somit Eintrittshemmer für HBV und HDV entgegen.

Insgesamt erscheint eine IFN α -vermittelte Reduktion der NTCP-Expression, wie sie im Rahmen der Koinfektion beobachtet werden konnte, logischer als eine Hochregulierung und würde zu den Ergebnissen von Giersch et al. aus HDV-infizierten Mäusen passen (Giersch et al. 2023). Interessanterweise kam es zu einem stärkeren Abfall der NTCP-Expression in unbehandelten HDV-1p-infizierten PHHs als in den HDV-1cc-infizierten Zellen, was die These unterstützen würde, dass eine NTCP-Reduktion allgemein mit einem besseren Therapieansprechen auf IFN α assoziiert ist, wie es für HDV-1p im Vergleich zu HDV-1cc der Fall zu sein scheint. Gegen diese Theorie spricht jedoch, dass sowohl in ko- als auch superinfizierten PHHs eine deutliche Reduktion der HDV-Viruslast durch IFN α eintrat, hier jedoch unterschiedliche Effekte in Bezug auf die NTCP-Expression vorlagen. Die

Diskordanz der Ergebnisse in dieser Arbeit könnte möglicherweise durch Stress in Zellkultur oder andere unbekannte Einflussfaktoren der jeweiligen Versuchsaufbauten zurückgeführt werden. Auch ein NTCP-Verlust durch eine Dedifferenzierung, die in PHHs in Zellkultur nach einiger Zeit auftritt (Lee et al. 2023) und auf die IFN α möglicherweise zusätzlich Einfluss nehmen könnte, wäre eine mögliche Erklärung. Wie aussagekräftig die Daten hierzu aufgrund der fehlenden Reproduzierbarkeit sind, bleibt fraglich und sollte bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Insgesamt ist die Theorie einer IFN α -induzierten Reduktion von NTCP durch IFN α also nur eine Hypothese und müsste in Folgeexperimenten und besser noch in Leberbiopsien von HDV-infizierten Patient:innen nach IFN α -Behandlung genauer untersucht werden. Ergänzend wäre zur weiteren Einschätzung der NTCP-Regulation zum Beispiel auch die Messung des Transkriptionsfaktors HNF4 α sinnvoll.

5.4 Zusammenfassung der Wirkungsweise von IFN α bei HDV-Infektion

Die abschließende Antwort, wie genau IFN α im Rahmen einer HDV-Infektion wirkt, ist derzeit nicht geklärt und wiederholt Forschungsgegenstand der aktuellen Literatur. Bei Patient:innen kommt es nur in weniger als einem Drittel zu einer anhaltenden Virussuppression durch IFN α (Abdrakhman et al. 2021), wobei die genauen Mechanismen oder Gründe für das Nichtansprechen nicht hinreichend geklärt sind. IFN α ist ein Immunmodulator und erzeugt eine antivirale Antwort über Aktivierung einer Immunantwort über den JAK-STAT-Signalweg (Pestka et al. 2004) sowie durch Induktion verschiedener ISGs (Giersch et al. 2017). ISGs können in verschiedene Bereiche viraler Lebenszyklen wie Zelleintritt oder Transport zum Zellkern eingreifen und tragen so zur antiviralen Antwort des Immunsystems bei (Schoggins 2019). Han et al. stellten durch IFN α -Behandlung von PHHs rund um den Infektionszeitpunkt außerdem fest, dass IFN α insbesondere die frühen Schritte im HDV-Lebenszyklus beeinflusst und primär den Viruseintritt in die Zelle und die Reinfektion anderer Hepatozyten sowie den Beginn der Virusreplikation hemmt (Han et al. 2011). Zhang et al. wiesen zudem eine Zellteilungs-vermittelte Wirkung von IFN α im Rahmen der HDV-Infektion nach, wohingegen sie in nicht proliferierenden Zellen keinen Effekt von IFN α fanden (Zhang et al. 2022). Dies liege möglicherweise an der Destabilisierung der HDV-RNA, die normalerweise im Zellkern repliziert, während der Zellteilung jedoch aufgrund der Auflösung der Kernmembran nicht mehr vor einem Abbau durch zelluläre Nukleasen geschützt werden könne (Zhang et al. 2022). Gleichzeitig beobachteten sie eine starke, rein HDV-vermittelte intrinsische Interferonantwort, die wiederum invers mit der Resonanz auf exogen verabreichtes IFN α korrelierte. Daraus leiteten sie die Hypothese ab, dass die intrinsische Interferonantwort bei hoher Viruslast bereits zu einer Sättigung der Signalkaskaden und

somit Unwirksamkeit von therapeutisch zugeführtem IFN α führt, welches die gleichen Kaskaden anstößt, und die HDV-Infektion somit resistent gegenüber IFN α werde (Zhang et al. 2022). Die gleiche These wurde auch von Chida et. al aufgestellt, bei denen die HDV-induzierte hepatische Interferonantwort zu einer Refraktärität von exogenem IFN α führte (Chida et al. 2023). Umgekehrt würde dies im klinischen Kontext bedeuten, dass insbesondere Patient:innen mit niedrigen HDV-Titern und somit geringer HDV-induzierter Interferonsekretion von der Therapie mit IFN α profitieren könnten, was auch in mehreren klinischen Studien beobachtet werden konnte (Zhang et al. 2022).

Fasst man die Annahmen bezüglich der Wirkung von exogen verabreichtem IFN α auf HDV zusammen, ergibt sich neben der Erzeugung einer allgemeinen antiviralen Antwort über Signalkaskaden des angeborenen Immunsystems mit ISG-Induktion außerdem die Hemmung in frühen Teilen des HDV-Lebenszyklus und eine Degradierung der HDV-RNA im Rahmen der Zellteilung. Insbesondere die beiden letztgenannten Wirkungsweisen würden zu der Beobachtung passen, dass ein synergistischer Effekt bei der Kombinationstherapie von IFN α und Bulevirtid beziehungsweise IFN λ und Lonafernib, einem Farnesyl-Transferase-Inhibitor, der den Zusammenbau von HDV mit HBsAg und so die Sekretion infektiöser HDV-Viren verhindert (Koh et al. 2015), auftritt (Koh et al. 2020, Wedemeyer et al. 2020). Eine Erklärung für dieses Phänomen wäre also die Hemmung der extrazellulären HDV-Ausbreitung durch Bulevirtid und Lonafernib und Hemmung der Zellteilungs-vermittelten HDV-Ausbreitung durch Interferone (Zhang et al. 2022).

Das Ziel dieser Arbeit war es, den HDV-1p-Virusstamm, der im Patienten zuvor ein anhaltendes Ansprechen auf eine Behandlung mit peg-IFN α gezeigt hatte, weiter zu charakterisieren und sein Ansprechen auf IFN α in vitro zu testen. Hierbei fand sich sowohl im Rahmen der Ko- als auch der Superinfektion eine starke Reduktion der Viruslast im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Während die These von Han et. al, dass IFN α die frühen Schritte im HDV-Lebenszyklus und somit auch die an der HDV-Ausbreitung beteiligten Schritte hemmt (Han et al. 2011), zu der Beobachtung bei der HDV-Superinfektion passt, in der es bis zum Ende des Versuches zu einem anhaltenden HDV-Spreading kam und dies durch IFN α erheblich abgebremst wurde, ist dies nicht auf die Ergebnisse der koinfizierten Zellen übertragbar. In diesen kam es auch in unbehandelten Kontrollen zu keiner weiteren Virusausbreitung (weder intra- noch extrazellulär zeigte sich ein Anstieg der HDV-Parameter) nach Beginn des Experimentes, was dadurch erklärt werden könnte, dass die PHHs zum Zeitpunkt der Isolation bereits über mehrere Wochen stabil infiziert waren. Dennoch würde die Hypothese, dass IFN α allgemein an Schritten im HDV-Lebenszyklus ansetzt, die für das extrazelluläre HDV-Spreading verantwortlich sind, erklären, warum sich in der HDV-Monoinfektion in kryokonservierten PHHs kein Effekt in Bezug auf eine Reduktion der HDV-RNA zeigte, obwohl es sich um den gleichen Virusstamm handelte und obwohl auch hier

eine starke ISG-Induktion durch IFN α beobachtet werden konnte. Da HDV zum Erhalt seiner Hülle und somit zur Sekretion aus einem Hepatozyten und Reinfektion neuer Hepatozyten HBV als Helfervirus benötigt (Sureau und Negro 2016), würde die Abwesenheit von HBV in diesem Versuchsaufbau und das somit fehlende extrazelluläre HDV-Spreading die ausbleibende Wirkung von IFN α in Teilen erklären.

Die Theorie von Zhang et al. bezüglich einer Zellteilungs-vermittelten Wirkung von IFN α scheint in der Versuchskonstellation dieser Arbeit hingegen eher nicht anwendbar zu sein (Zhang et al. 2022), da bei PHHs in vitro eine Proliferation und somit Zellteilung weitestgehend ausbleibt (Lee et al. 2023). Die Messung verschiedener Parameter, die Hinweise auf die Zellzahl liefern können, wie humanes beta-Globin, die Menge der Gesamt-RNA und eine visuelle Darstellung der PHHs mittels Lichtmikroskopie, bestätigte dies. Ein Zellteilungs-vermittelter Effekt ist natürlich trotzdem durchaus möglich und die Darstellung eines Proliferationsmarkers wie ki-67 wäre zum sicheren Ausschluss ergänzend sinnvoll gewesen. Die Wirkung von IFN α auf HDV-1p lässt sich so jedoch nicht ausreichend erklären. Andererseits scheint die Hypothese, dass eine starke intrinsische HDV-induzierte Immunantwort zu einer abgeschwächten Wirkung von exogen verabreichtem IFN α führen könnte (Chida et al. 2023, Zhang et al. 2022), möglicherweise auf den ausbleibenden Effekt von IFN α in der HDV-1cc-Monoinfektion zuzutreffen. Während es bei Vergleich der Monoinfektion mit den beiden Virenstämmen bei der HDV-1cc-Infektion zu einer höheren ISG-Induktion zu Beginn des Versuches kam und hier eine Reduktion der HDV-Viruslast gänzlich ausblieb, löste die IFN α -Gabe bei der HDV-1p-Infektion zwar nur eine sehr schwache und nicht signifikante, aber dennoch vorhandene Reduktion der HDV-RNA aus. Eine HDV-1cc-induzierte stärkere endogene Interferonantwort und folglich Erschöpfung der IFN-Signalkaskaden könnte das unterschiedliche Ansprechen der beiden Virenstämme auf IFN α erklären. Allerdings fand sich auch in ko- und superinfizierten Zellen bei Nutzung von HDV-1p eine starke intrinsische ISG-Induktion von ISG15, Mx1, CXCL10 sowie Stat1 und in koinfizierten PHHs trat die vermeintliche Induktion von HLA ein, obwohl es hier zu einer Virussupprimierung kam. Eine Gegenüberstellung der ISG-Induktion bei HDV-1p und HDV-1cc infizierten Hepatozyten im Beisein von HBV könnte möglicherweise zum genaueren Verständnis des Wirkmechanismus beitragen.

Eindeutige, reproduzierbare Belege dafür, dass IFN α möglicherweise einen Zelltod infizierter Hepatozyten auslösen kann, finden sich in der Literatur derzeit nicht. Eine Arbeitsgruppe diskutiert erhöhte hepatische Zelltod-Parameter in einer klinischen Studie nach Gabe von peg-IFN α , die jedoch letztlich am ehesten im Rahmen einer IFN α -induzierten HDV-RNA-Suppression mit reaktiver Zunahme der HBV-Replikation interpretiert wird (Anastasiou et al. 2021). In einer anderen Studie mit HBV-infizierten humanisierten Mäusen wurde eben-

falls die Theorie eines IFN α -vermittelten Zelltodes über die Reduktion der sogenannten *unfolded protein response* (UPR) aufgestellt, ein physiologischer Schutzmechanismus, welcher eine pathologische Proteinsynthese verringern beziehungsweise Abbau, Faltung und Sekretion entsprechender Proteine fördert und dessen Ausfall zu einem entsprechend erhöhten zellulären Stress mit anschließendem Zelltod führt (Baudi et al. 2021). Folgt man diesen Beobachtungen, wäre es also denkbar, dass die Reduktion der HDV-RNA durch Behandlung mit IFN α , die in dieser Arbeit in ko- und superinfizierten PHHs in vitro gezeigt werden konnte, lediglich auf einen Verlust vitaler HDV-infizierter Zellen zurückzuführen wäre. Andererseits wurde in anderen Studien, beispielsweise nach peg-IFN α -Behandlung humanisierter HBV- und HDV-infizierter Mäuse, eine IFN α -induzierte Apoptose widerlegt (Dühren et al. 2024, Giersch et al. 2023) und auch in dieser Arbeit konnte kein eindeutiger IFN α -assoziierter Zelltod nachgewiesen werden, sodass dieser Erklärungsansatz kein ausschlaggebender Faktor zu sein scheint.

Und selbst wenn es zu einer leichten Reduktion der Zellzahl aufgrund einer IFN α -induzierten Apoptose gekommen wäre, würde diese eine so starke Reduktion der Viruslast um bis zu 98 %, wie sie im Rahmen der Koinfektion nach 14-tägiger Behandlung auftrat, nicht wirklich erklären und macht einen solchen Wirkmechanismus ebenfalls unwahrscheinlich. Wie bereits ausführlich in Abschnitt 4.3. erläutert, scheint IFN α auch Einfluss auf die NTCP-Expression zu nehmen, was ebenfalls zu der These von Han et al. passt, dass IFN α insbesondere die frühen Schritte des HDV-Lebenszyklus hemmt (Han et al. 2011), die mit der extrazellulären HDV-Ausbreitung assoziiert sind. Allerdings waren die Ergebnisse in dieser Arbeit diesbezüglich widersprüchlich und nicht ausreichend signifikant, um hier eine sichere Schlussfolgerung zuzulassen. Dennoch könnte eine IFN α -getriggerte NTCP-Reduktion, wie sie auch zuvor in vivo beobachtet werden konnte (Giersch et al. 2023), ein möglicher zusätzlicher Wirkungsmechanismus von IFN α in Bezug auf die HDV-Infektion sein und würde den synergistischen Effekt bei Kombination von IFN α mit Bulevirtid ebenfalls erklären.

Zuvor konnte ein unterschiedliches Ansprechen auf IFN α in verschiedenen HDV-Genotypen beobachtet werden. Während HDV-3 beispielsweise regelhaft gut auf die Behandlung mit IFN α anspricht (Borzacov et al. 2016) und auch HDV-5 eine vergleichsweise gute Resonanz zeigt (Spaan et al. 2020), sind die Antwortraten bei anderen Genotypen eher gering. Die unterschiedlichen HDV-Genotypen haben jeweils eine Sequenzhomologie von über 80 %, die verschiedenen Subgenotypen sogar von über 84 %, wobei HDV-1 die größte intragenotypische genetische Heterogenität aufweist (Le Gal et al. 2017). Das unterschiedliche Ansprechen auf die Therapie mit IFN α , das diese Arbeit in Bezug auf den neuen Virusstamm HDV-1p verdeutlicht, unterstreicht die Hypothese, dass möglicherweise ein noch unbekannter Teil des HDV-Genoms, der bei den verschiedenen Genotypen, Subgenotypen

und letztlich auch einzelnen Virenstämmen variiert, für das Ansprechen auf IFN α (mit)verantwortlich ist.

Während sich für HDV-1cc in vitro und in vivo zuvor nie ein dauerhaftes Ansprechen auf IFN α gezeigt hatte (Chang et al. 2006, Chida et al. 2023, Han et al. 2011, Ilan et al. 1992, Lempp et al. 2019, McNair et al. 1994, Ye et al. 2019, Zhang et al. 2018) und dies jahrelang zu der Annahme führte, dass HDV in späteren Infektionsstadien generell resistent gegen IFN α zu sein scheint, konnte in dieser Arbeit eine deutliche IFN α -induzierte Reduktion der HDV-RNA bei Infektion mit dem neuen Virusstamm HDV-1p in ko- und superinfizierten PHHs demonstriert und somit die Annahme einer IFN α -Sensitivität von HDV-1p, die sich zuvor auch in vivo gezeigt hatte (Giersch et al. 2017), bekräftigt werden. HDV-1p wurde bereits im Vorfeld dieser Dissertation sequenziert (Hendricks 2022) und mit HDV-1cc verglichen, wobei hier kein eindeutiger Hinweis auf die ursächliche Sequenz für die IFN α -Resistenz von HDV-1cc gefunden werden konnte (Giersch et al. 2023). HDV-1p wurde bislang keinem HDV-1-Subgenotyp zugeordnet und ebenso wenig findet sich in der Literatur eine Angabe hierzu für den HDV-1cc-Virusstamm. Möglicherweise könnten ein abschließender Vergleich des Genoms von HDV-1p und HDV-1cc und die Gegenüberstellung mit weiteren Virenstämmen vom Genotyp 1 in Korrelation zu dessen Ansprechen auf IFN α gesetzt werden und einerseits zum besseren Verständnis des HDV-Lebenszyklus beitragen sowie andererseits Hinweise auf den viralen Mechanismus der Umgehung eines therapeutischen Effektes von IFN α liefern und weitere Wirkungsweisen von IFN α aufdecken. Sollte es gelingen, den Ursprung der IFN α -Resistenz im HDV-Genom zu finden, wäre dies ein erheblicher Fortschritt für die evidenzbasierte Medizin, welche es potenziell ermöglichen würde, Patient:innen zukünftig bereits vor Therapiebeginn eine Prognose über das Ansprechen auf IFN α geben zu können oder die Therapie etwa individuell anzupassen und entsprechend IFN α -basiert oder eher nur mit Alternativen wie beispielsweise Bulevirtid durchzuführen. So könnte man Nebenwirkungen von IFN α vermeiden und gleichzeitig eine zielgerichtete und vielversprechendere Therapie vornehmen.

5.5 Relevanz der Arbeit und Ausblick

Die Etablierung eines Zellkulturmodelles als Schnittstelle zwischen in vivo- und in vitro- Experimenten mit stabil koinfizierten PHHs und die Charakterisierung des neuen Virusstammes HDV-1p könnten die Grundlage für eine zielgerichtete Forschung bieten, die sich mit der Interaktion zwischen HDV und dem angeborenen Immunsystem sowie den Wirkmechanismen von IFN α im Rahmen einer HDV-Infektion beschäftigt. Sowohl das Zellkulturmodell als auch HDV-1p können dabei auch von anderen Forschungsgruppen genutzt werden und

erweitern das Repertoire und die Möglichkeiten der derzeitigen technischen Methoden, um beispielsweise auch andere Medikamente zu testen.

Diese Arbeit hat zudem gezeigt, dass es sinnvoll ist, zukünftig verschiedenen Virenstämme auch bei gleicher Fragestellung einzusetzen, um virusspezifische Unterschiede stärker herauszuarbeiten. Bis auf wenige Ausnahmen wurden in den letzten Jahren die meisten Versuche mit Fragestellung nach Wirkweise von IFN α allein mit HDV-1cc durchgeführt. Alle derzeit kursierenden Theorien und Hypothesen über die Wirkweise von IFN α bei HDV-Infektion basieren somit auf dem gleichen Virusstamm, der etwas unklaren Verhältnissen [Klonierung in Zellkultur und mehrmalige Transmission in Schimpansen, letztlich Isolation aus der Leber eines Waldmurmeltieres (Kuo et al. 1988)] entstammt. Da diese Arbeit Unterschiede zwischen HDV-1p und HDV-1cc in Bezug auf das IFN α -Ansprechen aufzeigt, ist durchaus denkbar, dass auch in anderen Bereichen Unterschiede bestehen, zum Beispiel in Bezug auf Lebenszyklus, Immunantwort oder Interaktion mit HBV, und dass die bisher getroffenen Annahmen nicht von einem auf den anderen Virusstamm übertragbar sind. Sinnvoll könnte daher auch die Isolation von Virenstämmen aus Patient:innen sein, die - wie bei dem Patienten, aus dem HDV-1p ursprünglich isoliert wurde - ein gutes Ansprechen auf IFN α zeigten, um diese folglich mit HDV-1p und HDV-1cc zur Aufdeckung einer ursächlichen Sequenz im Genom des jeweiligen Virus zu vergleichen. Auch ein Vergleich des Ansprechens auf andere Interferone oder Medikamente in verschiedenen Virenstämmen könnte weitere hilfreiche Erkenntnisse liefern.

Bei der Bewertung der Ergebnisse ist jedoch zu bedenken, dass die geschilderten technischen Probleme (zum Beispiel geringe Zellzahl im Rahmen der Leberzellisolation, keine Baseline bei Koinfektion und somit fehlende Erkenntnisse, wie sich Viruslast in ersten 7 Tagen nach IFN α -Gabe verändert), die teils fehlende Signifikanz der Ergebnisse (lediglich Triplikate je Bedingung, teils große Streubreite, fehlende Reproduzierbarkeit) oder ihre gelegentliche Widersprüchlichkeit (NTCP-Regulation durch IFN α) teilweise zu Einschränkungen für die Interpretation oder Verallgemeinerung der Erkenntnisse führen und zunächst weitere Forschungen erfordern. Da alle durchgeführten Versuche zudem unter Ausschaltung beziehungsweise Abwesenheit einer adaptiven Immunantwort stattfanden, diese aber bei Patient:innen durchaus Einfluss auf die Wirkweise von IFN α nehmen könnte, sind die Erkenntnisse aus den Versuchsreihen von den präklinischen Bedingungen möglicherweise nur bedingt auf die medizinische Praxis übertragbar.

6. Zusammenfassung

Pegyliertes Interferon alpha (peg-IFN α) wird zur Behandlung der chronischen Hepatitis D aufgrund mangelnder Alternativen aktuell weiterhin eingesetzt, führt jedoch nur bei weniger als einem Drittel aller Patient:innen zu einer anhaltenden Virussuppression. In verschiedenen Zellkultur- und Mausexperimenten wurde zudem immer wieder eine Resistenz seitens HDV gegenüber IFN α festgestellt. Dabei wurde jedoch stets der gleiche Virusstamm vom Genotyp 1 (HDV-1cc) verwendet. Ein neuer Virusstamm vom Genotyp 1 (HDV-1p) hingegen, der aus einem Patienten isoliert wurde, bei dem später eine anhaltende HDV-Suppression durch peg-IFN α erreicht wurde, zeigte in humanisierten Mäusen ein gutes Ansprechen auf IFN α . Dieser Virusstamm wurde im Folgenden sequenziert, kloniert und das Ansprechen von HDV-1p auf IFN α im Vergleich zu HDV-1cc in humanisierten Mäusen getestet, wobei erneut eine starke Reduktion der Viruslast eintrat. Ziel dieser Dissertation war es, das Ansprechen von HDV-1p in Zellkultur zu überprüfen und den neuen Virusstamm weiter zu charakterisieren.

Dafür wurde zunächst ein neues Zellkulturmodell verwendet, in dem in vivo stabil HBV- oder HBV/HDV-1p-infizierte PHHs isoliert, dann im Falle der HBV-Monoinfektion in vitro mit HDV-1p superinfiziert und schließlich für bis zu 14 Tage mit IFN α behandelt wurden. Hierbei zeigte sich in koinfizierten Zellen eine deutliche Reduktion der intra- und extrazellulären HDV-Viruslast um bis zu 98% durch IFN α und in superinfizierten Zellen konnte das HDV-Spreading um bis zu 91% gebremst werden. Im anschließenden direkten Vergleich der HDV-1p- und HDV-1cc-Monoinfektion im Rahmen eines herkömmlichen PHH-Versuches mit kommerziell erhältlichen PHHs konnte für beide Virenstämme hingegen kein eindeutiges Ansprechen auf IFN α festgestellt werden. HDV-1p führte in allen Versuchssettings zu einer starken Antwort des angeborenen Immunsystems und somit Induktion verschiedener ISGs (Mx1, ISG15, Stat1, CXCL10, HLA), welche durch Gabe von IFN α weiter verstärkt wurde. Im direkten Vergleich in der Monoinfektion löste HDV-1cc eine etwas stärkere ISG-Induktion aus als HDV-1p.

Während die genauen Wirkmechanismen von IFN α im Rahmen der HDV-Infektion derzeit nicht abschließend geklärt sind, zeigt diese Arbeit das Ansprechen auf IFN α eines neuen Virusstammes im Kontrast zu den multiplen vorherigen Zellkulturversuchen mit HDV-1cc und hebt die Notwendigkeit hervor, zukünftig weitere Virusstämme genauer zu charakterisieren und in der Forschung einzusetzen. Der Vergleich der Sequenzen unterschiedlicher Virusstämme könnte neue Erkenntnisse über Resistenzmechanismen und die Wirkweise von IFN α im Rahmen der HDV-Infektion liefern. Dafür könnte auch das neue Zellkulturmodell, welches insbesondere den Vorteil einer stabilen HBV/HDV-Koinfektion bietet, genutzt werden.

5. Summary

Pegylated interferon alpha (peg-IFN α) is often used as standard treatment for chronic hepatitis D due to a lack of alternatives, but only leads to sustained viral suppression in less than a third of all patients. In various cell culture and mouse experiments, HDV proved to be resistant to IFN α treatment. However, the same virus strain of genotype 1 (HDV-1cc) was used in all these experiments. In contrast, a new genotype 1 viral strain (HDV-1p), which was isolated from a patient who later achieved sustained HDV suppression by peg-IFN α , showed a good response to IFN α in humanized mice. This viral strain was subsequently sequenced, cloned and the response of HDV-1p to IFN α compared to HDV-1cc was tested in humanized mice, again showing a strong reduction in HDV viral loads. The aim of this work was to test the response of HDV-1p in cell culture and to further characterize the new virus strain.

For this purpose, a new cell culture model was used in which already in vivo stably HBV- or HBV/HDV-1p-infected PHHs were isolated, in case of HBV monoinfection superinfected with HDV-1p and treated with IFN α for up to 14 days. In coinfecting cells, IFN α decreased the intracellular and extracellular HDV viral load up to 98 % and in superinfected cells, HDV spreading was reduced by up to 91 %. However, in the subsequent direct comparison of HDV-1p and HDV-1cc monoinfection in a conventional PHH experiment with commercially available PHHs, no clear virological response to IFN α was observed for either virus strain. In all experimental settings, HDV-1p led to a strong response of the innate immune system and thus induction of various ISGs (Mx1, ISG15, Stat1, CXCL10, HLA), which was further enhanced by administration of IFN α . In a direct comparison in monoinfection, HDV-1cc triggered a slightly stronger ISG induction than HDV-1p.

While the exact mechanisms of action of IFN α in the context of HDV infection currently remain elusive, this work shows the response to IFN α of a new strain of virus in contrast to multiple previous cell culture experiments with HDV-1cc and highlights the need to characterize further virus strains more precisely and use them in future research. Comparing the sequences of different virus strains could provide new insights into resistance mechanisms and the mode of action of IFN α in the context of HDV infection. For this purpose, the new cell culture model could be used, especially offering the advantage of a stable HBV/HDV coinfection.

7. Literaturverzeichnis

- Abdrakhman, A., Ashimkhanova, A., Almawi, W.Y., 2021. Effectiveness of pegylated interferon monotherapy in the treatment of chronic hepatitis D virus infection: A meta-analysis. *Antiviral Res* 185, 104995. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104995>
- Ahn, J., Gish, R.G., 2014. Hepatitis D Virus: A Call to Screening. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 10, 647–686.
- Aldabe, R., Suárez-Amarán, L., Usai, C., González-Aseguinolaza, G., 2015. Animal Models of Chronic Hepatitis Delta Virus Infection Host–Virus Immunologic Interactions. *Pathogens* 4, 46–65. <https://doi.org/10.3390/pathogens4010046>
- Alfaiate, D., Lucifora, J., Abeywickrama-Samarakoon, N., Michelet, M., Testoni, B., Cortay, J.-C., Sureau, C., Zoulim, F., Dény, P., Durantel, D., 2016. HDV RNA replication is associated with HBV repression and interferon-stimulated genes induction in super-infected hepatocytes. *Antiviral Research* 136, 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.10.006>
- Ali, S., Mann-Nüttel, R., Schulze, A., Richter, L., Alferink, J., Scheu, S., 2019. Sources of Type I Interferons in Infectious Immunity: Plasmacytoid Dendritic Cells Not Always in the Driver's Seat. *Front Immunol* 10, 778. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00778>
- Aliasi-Sinai, L., Worthington, T., Lange, M., Kushner, T., 2023. Maternal-to-Child Transmission of Hepatitis B Virus and Hepatitis Delta Virus. *Clin Liver Dis* 27, 917–935. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2023.05.007>
- Allweiss, L., Gass, S., Giersch, K., Groth, A., Kah, J., Volz, T., Rapp, G., Schöbel, A., Lohse, A.W., Polywka, S., Pischke, S., Herker, E., Dandri, M., Lütgehetmann, M., 2016. Human liver chimeric mice as a new model of chronic hepatitis E virus infection and preclinical drug evaluation. *J Hepatol* 64, 1033–1040. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.011>
- Allweiss, L., Volmari, A., Suri, V., Wallin, J.J., Flaherty, J.F., Manuilov, D., Downie, B., Lütgehetmann, M., Bockmann, J.-H., Urban, S., Wedemeyer, H., Dandri, M., 2024. Blocking viral entry with bulevirtide reduces the number of HDV-infected hepatocytes in human liver biopsies. *J Hepatol* S0168-8278(24)00114–4. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2024.01.035>
- Allweiss, L., Volz, T., Giersch, K., Kah, J., Raffa, G., Petersen, J., Lohse, A.W., Beninati, C., Pollicino, T., Urban, S., Lütgehetmann, M., Dandri, M., 2018. Proliferation of primary human hepatocytes and prevention of hepatitis B virus reinfection efficiently deplete nuclear cccDNA in vivo. *Gut* 67, 542–552. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312162>
- Al-Mahtab, M., Roy, P.P., Khan, M.S.I., Akbar, S.M., 2020. Nobel Prize for the Discovery of Hepatitis B and C: A Brief History in Time. *Euroasian J Hepatogastroenterol* 10, 98–100. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10018-1328>
- Altstetter, S.M., Quitt, O., Pinci, F., Hornung, V., Lucko, A.M., Wisskirchen, K., Jung, S., Protzer, U., 2021. Hepatitis-D Virus Infection Is Not Impaired by Innate Immunity but Increases Cytotoxic T-Cell Activity. *Cells* 10, 3253. <https://doi.org/10.3390/cells10113253>
- Anastasiou, O.E., Caruntu, F.A., Curescu, M.G., Yalcin, K., Akarca, U.S., Gürel, S., Zeuzem, S., Erhardt, A., Lüth, S., Papatheodoridis, G.V., Keskin, O., Port, K., Radu, M., Celen, M.K., Idilman, R., Heidrich, B., Mederacke, I., von der Leyen, H., Kahlhöfer, J., von Karpowitz, M., Hardtke, S., Cornberg, M., Yurdaydin, C., Wedemeyer, H., 2024. Five-year follow-up of 96 weeks peginterferon plus tenofovir disoproxil fumarate in hepatitis D. *Liver Int* 44, 139–147. <https://doi.org/10.1111/liv.15745>

- Anastasiou, O.E., Yurdaydin, C., Maasoumy, B., Hardtke, S., Caruntu, F.A., Curescu, M.G., Yalcin, K., Akarca, U.S., Gürel, S., Zeuzem, S., Erhardt, A., Lüth, S., Papatheodoridis, G.V., Radu, M., Liebig, S., Bantel, H., Bremer, B., Manns, M.P., Cornberg, M., Wedemeyer, H., 2021. A transient early HBV-DNA increase during PEG-IFN α therapy of hepatitis D indicates loss of infected cells and is associated with HDV-RNA and HBsAg reduction. *J Viral Hepat* 28, 410–419. <https://doi.org/10.1111/jvh.13439>
- Appelman, M.D., Wettengel, J.M., Protzer, U., Oude Elferink, R.P.J., van de Graaf, S.F.J., 2021. Molecular regulation of the hepatic bile acid uptake transporter and HBV entry receptor NTCP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1866, 158960. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.158960>
- Aragona, M., Macagno, S., Caredda, F., Crivelli, O., Lavarini, C., Maran, E., Farci, P., Purcell, R.H., Rizzetto, M., 1987. Serological response to the hepatitis delta virus in hepatitis D. *Lancet* 1, 478–480. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(87\)92090-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(87)92090-3)
- Arango, M.-T., Quintero-Ronderos, P., Castiblanco, J., Montoya-Ortíz, G., 2013. Cell culture and cell analysis, in: *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. El Rosario University Press, pp. 741–754. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459464/> (Stand 31.10.2024).
- Asselah, T., Arama, S.S., Bogomolov, P., Bourliere, M., Fontaine, H., Gherlan, G.S., Gorodin, V., Hilleret, M.-N., Lazar, S., Mamonova, N., Viacheslav, M., Pantea, V., Placinta, G., Gournay, J., Raffi, F., Ratzu, V., Stern, C., Sagalova, O., Samuel, D., Stepanova, T., Syutkin, V., Streinu-Cercel, A., Zoulim, F., Roulot, D., 2021. Safety and efficacy of bulevirtide monotherapy and in combination with Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis delta: 24 weeks interim data of MYR204 Phase 2b study. *Journal of Hepatology* 75(2), S291.
- Asselah, T., Chulanov, V., Lampertico, P., Wedemeyer, H., Streinu-Cercel, A., Pântea, V., Lazar, S., Placinta, G., Gherlan, G.S., Bogomolov, P., Stepanova, T., Morozov, V., Syutkin, V., Sagalova, O., Manuilov, D., Mercier, R.-C., Ye, L., Da, B.L., Chee, G., Lau, A.H., Osinusi, A., Bourliere, M., Ratzu, V., Pol, S., Hilleret, M.-N., Zoulim, F., 2024a. Bulevirtide Combined with Pegylated Interferon for Chronic Hepatitis D. *N Engl J Med* 391, 133–143. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2314134>
- Asselah, T., Rizzetto, M., 2023. Hepatitis D Virus Infection. *New England Journal of Medicine* 389, 58–70. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2212151>
- Asselah, T., Streinu-Cercel, A., Jucov, A., Gane, E.J., Wedemeyer, H., Lampertico, P., Chattergoon, M.A., Wu, P., Maciejewski, S., Pilowa, C., Hassani, A., Correll, T., Hwang, C., Agarwal, K., 2024b. OS-127 Efficacy and safety of tobevibart (VIR-3434) alone or in combination with elebsiran (VIR-2218) in participants with chronic hepatitis delta virus infection: preliminary results from the phase 2 SOLSTICE trial in non-cirrhotic and compensated cirrhotic participants. *Journal of Hepatology* 80, S75–S76. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(24\)00565-8](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(24)00565-8)
- Baatarkhuu, O., Uugantsetseg, G., Munkh-Orshikh, D., Naranzul, N., Badamjav, S., Tserendagva, D., Amarsanaa, J., Do Young, K., 2017. Viral Hepatitis and Liver Diseases in Mongolia. *Euroasian J Hepatogastroenterol* 7, 68–72. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10018-1215>
- Bach, C., Lucifora, J., Delphin, M., Heydmann, L., Heuschkel, M.J., Pons, C., Goto, K., Scheers, E., Schuster, C., Durantel, D., Pauwels, F., Baumert, T.F., Verrier, E.R., 2023. A stable hepatitis D virus-producing cell line for host target and drug discovery. *Antiviral Res* 209, 105477. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105477>
- Baudi, I., Isogawa, M., Moalli, F., Onishi, M., Kawashima, K., Ishida, Y., Tateno, C., Sato, Y., Harashima, H., Ito, H., Ishikawa, T., Wakita, T., Iannaccone, M., Tanaka, Y., 2021. Interferon signaling suppresses the unfolded protein response and induces cell death

in hepatocytes accumulating hepatitis B surface antigen. *PLoS Pathog* 17, e1009228. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009228>

- Bazinet, M., Pântea, V., Cebotarescu, V., Cojuhari, L., Jimbei, P., Albrecht, J., Schmid, P., Le Gal, F., Gordien, E., Krawczyk, A., Mijočević, H., Karimzadeh, H., Roggendorf, M., Vaillant, A., 2017. Safety and efficacy of REP 2139 and pegylated interferon alfa-2a for treatment-naïve patients with chronic hepatitis B virus and hepatitis D virus co-infection (REP 301 and REP 301-LTF): a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 2, 877–889. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30288-1](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30288-1)
- Bazinet, M., Pântea, V., Cebotarescu, V., Cojuhari, L., Jimbei, P., Anderson, M., Gersch, J., Holzmayer, V., Elsner, C., Krawczyk, A., Kuhns, M.C., Cloherty, G., Dittmer, U., Vaillant, A., 2020. Persistent Control of Hepatitis B Virus and Hepatitis Delta Virus Infection Following REP 2139-Ca and Pegylated Interferon Therapy in Chronic Hepatitis B Virus/Hepatitis Delta Virus Coinfection. *Hepatol Commun* 5, 189–202. <https://doi.org/10.1002/hep4.1633>
- Beghin, J., Meier-Stephenson, V., 2023. Does hepatitis delta virus have a preference for hepatitis B virus genotype? A systematic review of the literature. *J Viral Hepat* 30, 906–913. <https://doi.org/10.1111/jvh.13889>
- Beltra, J.-C., Decaluwe, H., 2016. Cytokines and persistent viral infections. *Cytokine, Cytokines in inflammation, aging, cancer and obesity* 82, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.02.006>
- Bergmann, K.F., Gerin, J.L., 1986. Antigens of hepatitis delta virus in the liver and serum of humans and animals. *J Infect Dis* 154, 702–706. <https://doi.org/10.1093/infdis/154.4.702>
- Bhogal, R.H., Hodson, J., Bartlett, D.C., Weston, C.J., Curbishley, S.M., Haughton, E., Williams, K.T., Reynolds, G.M., Newsome, P.N., Adams, D.H., Afford, S.C., 2011. Isolation of Primary Human Hepatocytes from Normal and Diseased Liver Tissue: A One Hundred Liver Experience. *PLOS ONE* 6, e18222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018222>
- Bockmann, J.-H., Allweiss, L., Giersch, K., Volz, T., Lutgehetmann, M., Dandri, M., 2021a. PO-1631 A cell culture model of primary human hepatocytes derived from HBV-infected humanized mice for antiviral drug evaluation. *Journal of Hepatology, Abstracts of The International Liver Congress™ 2021 June 23–26, 2021* 75(2), S702.
- Bockmann, J.-H., Allweiss, L., Volz, T., Giersch, K., Ladiges, Y., Piroso, A., Lohse, A., Lutgehetmann, M., Dandri, M., 2021b. A cell culture model of high HBV replication in primary human hepatocytes derived from HBV infected humanized mice. *Z Gastroenterol* 59(1). <https://doi.org/10.1055/s-0040-1722084>
- Bockmann, J.-H., Grube, M., Hamed, V., von Felden, J., Landahl, J., Wehmeyer, M., Giersch, K., Hall, M.T., Murray, J.M., Dandri, M., Lüth, S., Lohse, A.W., Lutgehetmann, M., Schulze Zur Wiesch, J., 2020. High rates of cirrhosis and severe clinical events in patients with HBV/HDV co-infection: longitudinal analysis of a German cohort. *BMC Gastroenterol* 20, 24. <https://doi.org/10.1186/s12876-020-1168-9>
- Bogomolov, P., Alexandrov, A., Voronkova, N., Macievich, M., Kokina, K., Petrachenkova, M., Lehr, T., Lempp, F.A., Wedemeyer, H., Haag, M., Schwab, M., Haefeli, W.E., Blank, A., Urban, S., 2016. Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: First results of a phase Ib/IIa study. *Journal of Hepatology* 65, 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.016>
- Bordier, B.B., Ohkanda, J., Liu, P., Lee, S.-Y., Salazar, F.H., Marion, P.L., Ohashi, K., Meuse, L., Kay, M.A., Casey, J.L., Sebt, S.M., Hamilton, A.D., Glenn, J.S., 2003. In

- vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus. *J Clin Invest* 112, 407–414. <https://doi.org/10.1172/JCI17704>
- Borzacov, L.M.P., de Figueiredo Nicolete, L.D., Souza, L.F.B., dos Santos, A.O., Vieira, D.S., Salcedo, J.M.V., 2016. Treatment of hepatitis delta virus genotype 3 infection with peg-interferon and entecavir. *International Journal of Infectious Diseases* 46, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.03.017>
- Bosma, G.C., Custer, R.P., Bosma, M.J., 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301, 527–530. <https://doi.org/10.1038/301527a0>
- Botelho-Souza, L.F., Vasconcelos, M.P.A., Dos Santos, A. de O., Salcedo, J.M.V., Vieira, D.S., 2017. Hepatitis delta: virological and clinical aspects. *Virol J* 14, 177. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0845-y>
- Bouezzedine, F., Fardel, O., Gripon, P., 2015. Interleukin 6 inhibits HBV entry through NTCP down regulation. *Virology* 481, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.026>
- Broering, R., Zhang, X., Kottlil, S., Trippler, M., Jiang, M., Lu, M., Gerken, G., Schlaak, J.F., 2010. The interferon stimulated gene 15 functions as a proviral factor for the hepatitis C virus and as a regulator of the IFN response. *Gut* 59, 1111–1119. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.195545>
- Brunetto, M.R., Ricco, G., Negro, F., Wedemeyer, H., Yurdaydin, C., Asselah, T., Papa-theodoridis, G., Gheorghe, L., Agarwal, K., Farci, P., Buti, M., 2023. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis delta virus. *Journal of Hepatology* 79, 433–460. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.05.001>
- Burm, R., Maravelia, P., Ahlen, G., Ciesek, S., Perez, N.C., Pasetto, A., Urban, S., Houtte, F.V., Verhoye, L., Wedemeyer, H., Johansson, M., Frelin, L., Sällberg, M., Meuleman, P., 2023. Novel prime-boost immune-based therapy inhibiting both hepatitis B and D virus infections. *Gut* 72, 1186–1195. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327216>
- Burwitz, B.J., Zhou, Z., Li, W., 2020. Animal models for the study of human hepatitis B and D virus infection: New insights and progress. *Antiviral Res* 182, 104898. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104898>
- Buti, M., Esteban, R., Jardí, R., Esteban, J.-L., Guardia, J., 1986. Serological diagnosis of acute delta hepatitis. *Journal of Medical Virology* 18, 81–85. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890180110>
- Cao, X., Shores, E.W., Hu-Li, J., Anver, M.R., Kelsall, B.L., Russell, S.M., Drago, J., Noguchi, M., Grinberg, A., Bloom, E.T., 1995. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 2, 223–238. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90047-0](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90047-0)
- Cappy, P., Lucas, Q., Kankarafou, N., Sureau, C., Laperche, S., 2021. No Evidence of Hepatitis C Virus (HCV)-Assisted Hepatitis D Virus Propagation in a Large Cohort of HCV-Positive Blood Donors. *J Infect Dis* 223, 1376–1380. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa517>
- Casey, J.L., Gerin, J.L., 1995. Hepatitis D virus RNA editing: specific modification of adenosine in the antigenomic RNA. *J Virol* 69, 7593–7600. doi: 10.1128/JVI.69.12.7593-7600.1995.
- Casey, J.L., Niro, G.A., Engle, R.E., Vega, A., Gomez, H., McCarthy, M., Watts, D.M., Hyams, K.C., Gerin, J.L., 1996. Hepatitis B virus (HBV)/hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F. *J Infect Dis* 174, 920–926. <https://doi.org/10.1093/infdis/174.5.920>

- Chang, F.L., Chen, P.J., Tu, S.J., Wang, C.J., Chen, D.S., 1991. The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8490–8494. doi: 10.1073/pnas.88.19.8490.
- Chang, J., Nie, X., Gudima, S., Taylor, J., 2006. Action of Inhibitors on Accumulation of Processed Hepatitis Delta Virus RNAs. *J Virol* 80, 3205–3214. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3205-3214.2006>
- Chang, J., Sigal, L.J., Lerro, A., Taylor, J., 2001. Replication of the Human Hepatitis Delta Virus Genome Is Initiated in Mouse Hepatocytes following Intravenous Injection of Naked DNA or RNA Sequences. *Journal of Virology* 75, 3469–3473. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.7.3469-3473.2001>
- Chang, M.F., Baker, S.C., Soe, L.H., Kamahora, T., Keck, J.G., Makino, S., Govindarajan, S., Lai, M.M., 1988. Human hepatitis delta antigen is a nuclear phosphoprotein with RNA-binding activity. *J Virol* 62, 2403–2410. <https://doi.org/10.1128/JVI.62.7.2403-2410.1988>
- Chao, M., Hsieh, S.Y., Taylor, J., 1990. Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *J Virol* 64, 5066–5069.
- Chao YC, Chang MF, Gust I, Lai MM. 1990. Sequence conservation and divergence of hepatitis delta virus RNA. *Virology*, 178(2):384-92. doi: 10.1016/0042-6822(90)90335-o.
- Chemin, I., Pujol, F.H., Scholtès, C., Loureiro, C.L., Amirache, F., Levrero, M., Zoulim, F., Pérez-Vargas, J., Cosset, F., 2021. Preliminary Evidence for Hepatitis Delta Virus Exposure in Patients Who Are Apparently Not Infected With Hepatitis B Virus. *Hepatology* 73, 861–864. <https://doi.org/10.1002/hep.31453>
- Chen, H.-Y., Shen, D.-T., Ji, D.-Z., Han, P.-C., Zhang, W.-M., Ma, J.-F., Chen, W.-S., Goyal, H., Pan, S., Xu, H.-G., 2019. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut* 68, 512–521. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316601>
- Chen, J., Li, L., Yin, Q., Shen, T., 2023. A review of epidemiology and clinical relevance of Hepatitis B virus genotypes and subgenotypes. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 47, 102180. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2023.102180>
- Chen, L.-Y., Pang, X.-Y., Goyal, H., Yang, R.-X., Xu, H.-G., 2021. Hepatitis D: challenges in the estimation of true prevalence and laboratory diagnosis. *Gut Pathog* 13, 66. <https://doi.org/10.1186/s13099-021-00462-0>
- Chen, P.J., Kalpana, G., Goldberg, J., Mason, W., Werner, B., Gerin, J., Taylor, J., 1986. Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83, 8774–8778. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.22.8774>
- Chen, S., Ren, F., Huang, X., Xu, L., Gao, Y., Zhang, X., Cao, Y., Fan, Z., Tian, Y., Liu, M., 2022. Underestimated Prevalence of HIV, Hepatitis B Virus (HBV), and Hepatitis D Virus (HDV) Triple Infection Globally: Systematic Review and Meta-analysis. *JMIR Public Health Surveill* 8, e37016. <https://doi.org/10.2196/37016>
- Chida, T., Ishida, Y., Morioka, S., Sugahara, G., Han, C., Lam, B., Yamasaki, C., Sugahara, R., Li, M., Tanaka, Y., Liang, T.J., Tateno, C., Saito, T., 2023. Persistent hepatic IFN system activation in HBV-HDV infection determines viral replication dynamics and therapeutic response. *JCI Insight* 8, e162404. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.162404>
- Chiou, W.-C., Lyu, Y.-S., Hsia, T.-L., Chen, J.-C., Lin, L.-C., Chang, M.-F., Hsu, M.-S., Huang, C., 2024. Ergosterol peroxide blocks HDV infection as a novel entry inhibitor

- by targeting human NTCP receptor. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 170, 116077. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.116077>
- Chou, H.-C., Hsieh, T.-Y., Sheu, G.-T., Lai, M.M.C., 1998. Hepatitis Delta Antigen Mediates the Nuclear Import of Hepatitis Delta Virus RNA. *J Virol* 72, 3684–3690.
- Collier, M.G., Schillie, S., 2018. Hepatitis B and Hepatitis D Viruses, in: *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. Elsevier, pp. 1107–1114.e4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00213-9>
- Coppola, N., Alessio, L., Onorato, L., Sagnelli, C., Sagnelli, E., Pisaturo, M., 2019. HDV infection in immigrant populations. *Journal of Medical Virology* 91, 2049–2058. <https://doi.org/10.1002/jmv.25570>
- Cornberg, M., Sandmann, L., Protzer, U., Niederau, C., Tacke, F., Berg, T., Glebe, D., Jilg, W., Wedemeyer, H., Wirth, S., Höner Zu Siederdissen, C., Lynen-Jansen, P., Van Leeuwen, P., Petersen, J., Collaborators:, 2021. S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion – (AWMF-Regis-ter-Nr. 021-11). *Z Gastroenterol* 59, 691–776. <https://doi.org/10.1055/a-1498-2512>
- Cruz-Tapias, P., Castiblanco, J., Anaya, J.-M., 2013. Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation, in: *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. El Rosario University Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459467/> (Stand 31.10.2024 10:29 Uhr).
- Da, B.L., Heller, T., Koh, C., 2019. Hepatitis D infection: from initial discovery to current investigational therapies. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 7, 231–245. <https://doi.org/10.1093/gastro/goz023>
- Da, B.L., Surana, P., Kleiner, D.E., Heller, T., Koh, C., 2020. The Delta-4 fibrosis score (D4FS): A novel fibrosis score in chronic hepatitis D. *Antiviral Research* 174, 104691. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104691>
- Dandri, M., Bertoletti, A., Lütgehetmann, M., 2021. Innate immunity in hepatitis B and D virus infection: consequences for viral persistence, inflammation, and T cell recognition. *Semin Immunopathol* 43, 535–548. <https://doi.org/10.1007/s00281-021-00864-x>
- Dandri, M., Burda, M.R., Török, E., Pollok, J.M., Iwanska, A., Sommer, G., Rogiers, X., Rogler, C.E., Gupta, S., Will, H., Greten, H., Petersen, J., 2001. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology* 33, 981–988. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.23314>
- Dandri, M., Lütgehetmann, M., 2014. Mouse models of hepatitis B and delta virus infection. *Journal of Immunological Methods, Analysis of Human Infectious Diseases in Murine Models* 410, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.03.002>
- Dandri, M., Petersen, J., 2017. Animal models of HBV infection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, Hepatitis B* 31, 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2017.04.014>
- Dandri, M., Petersen, J., 2012. Chimeric mouse model of hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* 56, 493–495. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.05.037>
- Davidson, M.D., Khetani, S.R., 2020. Intermittent Starvation Extends the Functional Life-time of Primary Human Hepatocyte Cultures. *Toxicol Sci* 174, 266–277. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa003>
- De Crignis, E., Hossain, T., Romal, S., Carofiglio, F., Moulos, P., Khalid, M.M., Rao, S., Bazrafshan, A., Verstegen, M.M., Pourfarzad, F., Koutsothanassis, C., Gehart, H., Kan, T.W., Palstra, R.-J., Boucher, C., IJzermans, J.N., Huch, M., Boj, S.F., Vries, R., Clevers, H., van der Laan, L.J., Hatzis, P., Mahmoudi, T., 2021. Application of human

liver organoids as a patient-derived primary model for HBV infection and related hepatocellular carcinoma. *Elife* 10, e60747. <https://doi.org/10.7554/eLife.60747>

- De Ledingham, V., Guyader, D., Metivier, S., Hilleret, M.-N., Fontaine, H., Roche, B., Ganne-Carrie, N., d'Alteroche, L., Loustaud-Ratti, V., Gervais, A., Stern, C., Alric, L., Fouchard-Hubert, I., Asselah, T., Lacombe, K., Zoulim, F., Dumortier, J., Minello, A., Lascoux-Combe, C., Muti, L., Ollivier-Hourmand, I., Larrey, D., Leroy, V., Rosa, I., Chas, J., Heluwaert, F., Borentain, P., Archambeaud, I., Prouvost-Keller, B., Si Ahmed, S.N., Roulot, D., 2021. Safety and Efficacy of 2 mg Bulevirtide in Patients with Chronic HBV/HDV Co-Infection: First Real-World Results French Early Access Program. *Oral Abstracts. Hepatology* 74():p 1-156. DOI: 10.1002/hep.32187Hepatology 74.
- Der Spiegel, 1984. Tod durch Huckepack-Viren. *Der Spiegel*. Ausgabe 37, Artikel 69. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/tod-durch-huckepack-viren-a-45d13680-0002-0001-0000-000013511167?context=issue> (Stand 31.10.2024, 10:15 Uhr).
- Duehren, S., Uchida, T., Tsuge, M., Hiraga, N., Uprichard, S.L., Etzion, O., Glenn, J., Koh, C., Heller, T., Cotler, S.J., Oka, S., Chayama, K., Dahari, H., 2024. Interferon alpha induces a stronger antiviral effect than interferon lambda in HBV/HDV infected humanized mice. *Virus Research* 349, 199451. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2024.199451>
- Dusheiko, G., Agarwal, K., Maini, M.K., 2023. New Approaches to Chronic Hepatitis B. *N Engl J Med* 388, 55–69. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2211764>
- Elaut, G., Henkens, T., Papeleu, P., Snykers, S., Vinken, M., Vanhaecke, T., Rogiers, V., 2006. Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab* 7, 629–660. <https://doi.org/10.2174/138920006778017759>
- EMA, 2024. Hepcludex | European Medicines Agency. URL <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/hepcludex> (Stand 21.01.2024, 17:26 Uhr).
- Engelke, M., Mills, K., Seitz, S., Simon, P., Gripon, P., Schnölzer, M., Urban, S., 2006. Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology* 43, 750–760. <https://doi.org/10.1002/hep.21112>
- Engle, R.E., De Battista, D., Danoff, E.J., Nguyen, H., Chen, Z., Lusso, P., Purcell, R.H., Farci, P., 2020. Distinct Cytokine Profiles Correlate with Disease Severity and Outcome in Longitudinal Studies of Acute Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus Infection in Chimpanzees. *mBio* 11, e02580-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02580-20>
- Etzion, O., Hamid, S., Lurie, Y., Gane, E.J., Yardeni, D., Duehren, S., Bader, N., Nevo-Shor, A., Channa, S.M., Cotler, S.J., Mawani, M., Parkash, O., Dahari, H., Choong, I., Glenn, J.S., 2023. Treatment of chronic hepatitis D with peginterferon lambda—the phase 2 LIMIT-1 clinical trial. *Hepatology* 77, 2093–2103. <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000309>
- Farci, P., Niro, G., 2012. Clinical Features of Hepatitis D. *Semin Liver Dis* 32, 228–236. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1323628>
- Ferns, R.B., Nastouli, E., Garson, J.A., 2012. Quantitation of hepatitis delta virus using a single-step internally controlled real-time RT-qPCR and a full-length genomic RNA calibration standard. *J Virol Methods* 179, 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.11.001>
- François-Souquière, S., Makuwa, M., Bisvigou, U., Kazanji, M., 2016. Epidemiological and molecular features of hepatitis B and hepatitis delta virus transmission in a remote rural community in central Africa. *Infection, Genetics and Evolution* 39, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.12.021>

- Galle, P.R., Forner, A., Llovet, J.M., Mazzaferro, V., Piscaglia, F., Raoul, J.-L., Schirmacher, P., Vilgrain, V., 2018. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 69, 182–236. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019>
- Gane, E., Verdon, D.J., Brooks, A.E., Gaggar, A., Nguyen, A.H., Subramanian, G.M., Schwabe, C., Dunbar, P.R., 2019. Anti-PD-1 blockade with nivolumab with and without therapeutic vaccination for virally suppressed chronic hepatitis B: A pilot study. *J Hepatol* 71, 900–907. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.028>
- Gerin, J.L., 2001. Animal models of hepatitis delta virus infection and disease. *ILAR J* 42, 103–106. <https://doi.org/10.1093/ilar.42.2.103>
- Ghany, M.G., 2023. A Glimmer of Hope for an Orphan Disease. *New England Journal of Medicine* 389, 81–82. <https://doi.org/10.1056/NEJMe2304147>
- Ghany, M.G., Buti, M., Lampertico, P., Lee, H.M., 2023. Guidance on treatment endpoints and study design for clinical trials aiming to achieve cure in chronic hepatitis B and D: Report from the 2022 AASLD-EASL HBV-HDV Treatment Endpoints Conference. *Journal of Hepatology* 79, 1254–1269. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.06.002>
- Giersch, K., Allweiss, L., Volz, T., Helbig, M., Bierwolf, J., Lohse, A.W., Pollok, J.M., Petersen, J., Dandri, M., Lütgehetmann, M., 2015. Hepatitis Delta co-infection in humanized mice leads to pronounced induction of innate immune responses in comparison to HBV mono-infection. *Journal of Hepatology* 63, 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.03.011>
- Giersch, K., Bhadra, O.D., Volz, T., Allweiss, L., Riecken, K., Fehse, B., Lohse, A.W., Petersen, J., Sureau, C., Urban, S., Dandri, M., Lütgehetmann, M., 2019. Hepatitis delta virus persists during liver regeneration and is amplified through cell division both in vitro and in vivo. *Gut* 68, 150–157. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314713>
- Giersch, K., Dandri, M., 2021. In Vivo Models of HDV Infection: Is Humanizing NTCP Enough? *Viruses* 13, 588. <https://doi.org/10.3390/v13040588>
- Giersch, K., Dandri, M., 2015. Hepatitis B and Delta Virus: Advances on Studies about Interactions between the Two Viruses and the Infected Hepatocyte. *J Clin Transl Hepatol* 3, 220–229. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2015.00018>
- Giersch, K., Goldmann, N., Hermanussen, L., Hendricks, L., Volz, T., Bockmann, J.-H., Allweiss, L., Lohse, A., Petersen, J., Lütgehetmann, M., Glebe, D., Dandri, M., 2021a. PO-1707 Cloning and in vivo characterization of a new hepatitis D virus genotype 1 strain from a patient achieving sustained virus response to interferon alpha treatment. *Journal of Hepatology, Abstracts of The International Liver Congress™ 2021 June 23–26, 2021* 75, S702.
- Giersch, K., Helbig, M., Volz, T., Allweiss, L., Mancke, L.V., Lohse, A.W., Polywka, S., Pollok, J.M., Petersen, J., Taylor, J., Dandri, M., Lütgehetmann, M., 2014. Persistent hepatitis D virus mono-infection in humanized mice is efficiently converted by hepatitis B virus to a productive co-infection. *J Hepatol* 60, 538–544. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.11.010>
- Giersch, K., Hermanussen, L., Volz, T., Kah, J., Allweiss, L., Casey, J., Sureau, C., Dandri, M., Lütgehetmann, M., 2021b. Murine hepatocytes do not support persistence of Hepatitis D virus mono-infection in vivo. *Liver International* 41, 410–419. <https://doi.org/10.1111/liv.14677>
- Giersch, K., Hermanussen, L., Volz, T., Volmari, A., Allweiss, L., Sureau, C., Casey, J., Huang, J., Fischer, N., Lütgehetmann, M., Dandri, M., 2021c. Strong Replication Interference Between Hepatitis Delta Viruses in Human Liver Chimeric Mice. *Front Microbiol* 12, 671466. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.671466>

- Giersch, K., Homs, M., Volz, T., Helbig, M., Allweiss, L., Lohse, A.W., Petersen, J., Buti, M., Pollicino, T., Sureau, C., Dandri, M., Lütgehetmann, M., 2017. Both interferon alpha and lambda can reduce all intrahepatic HDV infection markers in HBV/HDV infected humanized mice. *Sci Rep* 7, 3757. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03946-9>
- Giersch, K., Perez-Gonzalez, P., Hendricks, L., Goldmann, N., Kolbe, J., Hermanussen, L., Bockmann, J.-H., Volz, T., Volmari, A., Allweiss, L., Petersen, J., Glebe, D., Lütgehetmann, M., Dandri, M., 2023. Strain-specific responsiveness of hepatitis D virus to interferon-alpha treatment. *JHEP Rep* 5, 100673. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2023.100673>
- Gill, U.S., 2023. The immune landscape in hepatitis delta virus infection—Still an open field. *Journal of Viral Hepatitis* 30, 22–26. <https://doi.org/10.1111/jvh.13785>
- Gillich, N., Zhang, Z., Binder, M., Urban, S., Bartenschlager, R., 2023. Effect of variants in LGP2 on MDA5-mediated activation of interferon response and suppression of hepatitis D virus replication. *J Hepatol* 78, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.08.041>
- Glenn, J.S., Watson, J.A., Havel, C.M., White, J.M., 1992. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science (New York, N.Y.)* 256. <https://doi.org/10.1126/science.1598578>
- Gómez-Lechón, M.J., O'Connor, E., Castell, J.V., Jover, R., 2002. Sensitive Markers Used to Identify Compounds That Trigger Apoptosis in Cultured Hepatocytes. *Toxicological Sciences* 65, 299–308. <https://doi.org/10.1093/toxsci/65.2.299>
- Greco-Stewart, V.S., Schissel, E., Pelchat, M., 2009. The hepatitis delta virus RNA genome interacts with the human RNA polymerases I and III. *Virology* 386, 12–15. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.007>
- Greco, L.I., Sultana, C., Pavel-Tanasa, M., Ruta, S.M., Chivu-Economescu, M., Matei, L., Ursu, R.G., Iftimi, E., Iancu, L.S., 2023. Non-Invasive Prediction Scores for Hepatitis B Virus- and Hepatitis D Virus-Infected Patients—A Cohort from the North-Eastern Part of Romania. *Microorganisms* 11, 2895. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122895>
- Gripon, P., Diot, C., Guguen-Guillouzo, C., 1993. Reproducible High Level Infection of Cultured Adult Human Hepatocytes by Hepatitis B Virus: Effect of Polyethylene Glycol on Adsorption and Penetration. *Virology* 192, 534–540. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1069>
- Gripon, P., Diot, C., Thézé, N., Fourel, I., Loreal, O., Brechot, C., Guguen-Guillouzo, C., 1988. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol* 62, 4136–4143. <https://doi.org/10.1128/JVI.62.11.4136-4143.1988>
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., Guguen-Guillouzo, C., 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 15655–15660. <https://doi.org/10.1073/pnas.232137699>
- Gripon, P., Ribiere, O., Cadranet, J.F., Pelletier, S., Pillot, B., Emerit, J., Opolon, P., 1987. Long-term delta antigenaemia without appearance of delta antibody in two immunodeficient patients. *Lancet* 1, 1031. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(87\)92293-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(87)92293-8)
- Groth, C., Maric, J., Garcés Lázaro, I., Hofman, T., Zhang, Z., Ni, Y., Keller, F., Seufert, I., Hofmann, M., Neumann-Haefelin, C., Sticht, C., Rippe, K., Urban, S., Cerwenka, A., 2023. Hepatitis D infection induces IFN- β -mediated NK cell activation and TRAIL-dependent cytotoxicity. *Front Immunol* 14, 1287367. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1287367>

- Gudima, S., He, Y., Meier, A., Chang, J., Chen, R., Jarnik, M., Nicolas, E., Bruss, V., Taylor, J., 2007. Assembly of Hepatitis Delta Virus: Particle Characterization, Including the Ability To Infect Primary Human Hepatocytes. *J Virol* 81, 3608–3617. <https://doi.org/10.1128/JVI.02277-06>
- Guo, H., Urban, S., Wang, W., 2023. In vitro cell culture models to study hepatitis B and D virus infection. *Front Microbiol* 14, 1169770. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1169770>
- Guo, Y., Lu, H., Xu, L., Idris, N.F.B., Li, Y., Hu, J., Huang, A., TU, Z., 2019. The response of hepatitis B virus genotype to interferon is associated with a mutation in the interferon-stimulated response element. *Medicine (Baltimore)* 98, e18442. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018442>
- Haller, O., Staeheli, P., Schwemmle, M., Kochs, G., 2015. Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity. *Trends Microbiol* 23, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.003>
- Han, B., Mo, H., Svarovskaia, E., Mateo, R., 2021. A primary human hepatocyte/hepatic stellate cell co-culture system for improved in vitro HBV replication. *Virology* 559, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.03.012>
- Han, Z., Nogusa, S., Nicolas, E., Balachandran, S., Taylor, J., 2011. Interferon impedes an early step of hepatitis delta virus infection. *PLoS One* 6, e22415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022415>
- Hantz, O., Parent, R., Durantel, D., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C., Zoulim, F., 2009. Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *Journal of General Virology* 90, 127–135. <https://doi.org/10.1099/vir.0.004861-0>
- Hartwig, D., Schütte, C., Warnecke, J., Dorn, I., Hennig, H., Kirchner, H., Schlenke, P., 2006. The large form of ADAR 1 is responsible for enhanced hepatitis delta virus RNA editing in interferon- α -stimulated host cells. *Journal of Viral Hepatitis* 13, 150–157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2005.00663.x>
- He, W., Cao, Z., Mao, F., Ren, B., Li, Y., Li, D., Li, H., Peng, B., Yan, H., Qi, Y., Sun, Y., Wang, F., Sui, J., Li, W., 2016. Modification of Three Amino Acids in Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide Renders Mice Susceptible to Infection with Hepatitis D Virus In Vivo. *J Virol* 90, 8866–8874. <https://doi.org/10.1128/JVI.00901-16>
- He, W., Ren, B., Mao, F., Jing, Z., Li, Y., Liu, Y., Peng, B., Yan, H., Qi, Y., Sun, Y., Guo, J.-T., Sui, J., Wang, F., Li, W., 2015. Hepatitis D Virus Infection of Mice Expressing Human Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide. *PLoS Pathog* 11, e1004840. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004840>
- Heidrich, B., Yurdaydin, C., Kabaçam, G., Ratsch, B.A., Zachou, K., Bremer, B., Dalekos, G.N., Erhardt, A., Tabak, F., Yalcin, K., Gürel, S., Zeuzem, S., Cornberg, M., Bock, C.-T., Manns, M.P., Wedemeyer, H., Group, H.-1 S., 2014. Late HDV RNA relapse after peginterferon alpha-based therapy of chronic hepatitis delta. *Hepatology* 60, 87–97. <https://doi.org/10.1002/hep.27102>
- Hendricks, L.F., 2022. Study of antiviral mechanisms induced by interferon in HDV infection using human liver chimeric mice. *Med. Dissertation. Universität Hamburg.*
- Hermanussen, L., 2021. Hepatitis-D-Virusstämme: Interaktion in Koinfektion und spezifisches Interferon- α -Therapieansprechen. *Med. Dissertation. Universität Hamburg.*
- Hermanussen, L., Lampalzer, S., Bockmann, J.-H., Ziegler, A.E., Piecha, F., Dandri, M., Pischke, S., Haag, F., Lohse, A.W., Lütgehetmann, M., Weiler-Normann, C., zur Wiesch, J.S., 2023. Non-organ-specific autoantibodies with unspecific patterns are a

- frequent para-infectious feature of chronic hepatitis D. *Front Med (Lausanne)* 10, 1169096. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1169096>
- Hesterman, M.C., Furrer, S.V., Fallon, B.S., Weller, M.L., 2023. Analysis of Hepatitis D Virus in Minor Salivary Gland of Sjögren's Disease. *J Dent Res* 102, 1272–1279. <https://doi.org/10.1177/00220345231186394>
- Heuschkel, M.J., Bach, C., Meiss-Heydmann, L., Gerges, E., Felli, E., Giannone, F., Pessaux, P., Schuster, C., Lucifora, J., Baumert, T.F., Verrier, E.R., 2024. JAK1 promotes HDV replication and is a potential target for antiviral therapy. *J Hepatol* 80, 220–231. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.10.030>
- Heuschkel, M.J., Baumert, T.F., Verrier, E.R., 2021. Cell Culture Models for the Study of Hepatitis D Virus Entry and Infection. *Viruses* 13, 1532. <https://doi.org/10.3390/v13081532>
- Hintermann, E., Bayer, M., Pfeilschifter, J.M., Luster, A.D., Christen, U., 2010. CXCL10 promotes liver fibrosis by prevention of NK cell mediated hepatic stellate cell inactivation. *J Autoimmun* 35, 10.1016/j.jaut.2010.09.003. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2010.09.003>
- Hoblos, R., Kefalakes, H., 2023. Immunology of hepatitis D virus infection: General concepts and present evidence. *Liver International* 43, 47–59. <https://doi.org/10.1111/liv.15424>
- Hollnberger, J., Liu, Y., Xu, S., Chang, S., Martin, R., Manhas, S., Aeschbacher, T., Han, B., Yazdi, T., May, L., Han, D., Shornikov, A., Flaherty, J., Manuilov, D., Suri, V., Aselah, T., Lampertico, P., Wedemeyer, H., Aleman, S., Richards, C., Mateo, R., Maiorova, E., Cihlar, T., Mo, H., Urban, S., 2023. No virologic resistance to bulevirtide monotherapy detected in patients through 24 weeks treatment in phase II and III clinical trials for chronic hepatitis delta. *J Hepatol* 79, 657–665. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.04.027>
- Hughes, S.A., Wedemeyer, H., Harrison, P.M., 2011. Hepatitis delta virus. *The Lancet* 378, 73–85. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61931-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61931-9)
- Hwang, S.B., Lai, M.M., 1993. Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen. *J Virol* 67, 7659–7662. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.12.7659-7662.1993>
- Ilan, Y., Klein, A., Taylor, J., Tur-Kaspa, R., 1992. Resistance of hepatitis delta virus replication to interferon-alpha treatment in transfected human cells. *J Infect Dis* 166, 1164–1166. <https://doi.org/10.1093/infdis/166.5.1164>
- Ishida, Y., Yamasaki, C., Yanagi, A., Yoshizane, Y., Fujikawa, K., Watashi, K., Abe, H., Wakita, T., Hayes, C.N., Chayama, K., Tateno, C., 2015. Novel Robust in Vitro Hepatitis B Virus Infection Model Using Fresh Human Hepatocytes Isolated from Humanized Mice. *The American Journal of Pathology* 185, 1275–1285. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.01.028>
- Iwamoto, M., Saso, W., Sugiyama, R., Ishii, K., Ohki, M., Nagamori, S., Suzuki, R., Aizaki, H., Ryo, A., Yun, J.-H., Park, S.-Y., Ohtani, N., Muramatsu, M., Iwami, S., Tanaka, Y., Sureau, C., Wakita, T., Watashi, K., 2019. Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 8487–8492. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811064116>
- Jackson, K., MacLachlan, J., Cowie, B., Locarnini, S., Bowden, S., Higgins, N., Karapanagiotidis, T., Nicholson, S., Littlejohn, M., 2018. Epidemiology and phylogenetic analysis of hepatitis D virus infection in Australia. *Intern Med J* 48, 1308–1317. <https://doi.org/10.1111/imj.13967>
- Jarczák, D., Nierhaus, A., 2022. Cytokine Storm-Definition, Causes, and Implications. *Int J Mol Sci* 23, 11740. <https://doi.org/10.3390/ijms231911740>

- Joshi, S.S., Sadler, M., Patel, N.H., Osiowy, C., Fonseca, K., Coffin, C.S., 2023. Systemic cytokine and viral antigen-specific responses in hepatitis D virus RNA positive versus HDV RNA negative patients. *Front Med (Lausanne)* 10, 1125139. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1125139>
- Jung, S., Altstetter, S.M., Protzer, U., 2020a. Innate immune recognition and modulation in hepatitis D virus infection. *World Journal of Gastroenterology* 26, 2781–2791. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i21.2781>
- Jung, S., Altstetter, S.M., Wilsch, F., Shein, M., Schütz, A.K., Protzer, U., 2020b. Extracellular vesicles derived from Hepatitis-D Virus infected cells induce a proinflammatory cytokine response in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. *Matters* 2020, 1–10. <https://doi.org/10.48565/rh7j-hr59>
- Kabaçam, G., Onder, F.O., Yakut, M., Seven, G., Karatayli, S.C., Karatayli, E., Savas, B., Idilman, R., Bozdayi, A.M., Yurdaydin, C., 2012. Entecavir treatment of chronic hepatitis D. *Clin Infect Dis* 55, 645–650. <https://doi.org/10.1093/cid/cis459>
- Kamal, H., Lindahl, K., Ingre, M., Gahrton, C., Karkkonen, K., Nowak, P., Vesterbacka, J., Stål, P., Wedemeyer, H., Duberg, A.-S., Aleman, S., 2024. The cascade of care for patients with chronic hepatitis delta in Southern Stockholm, Sweden for the past 30 years. *Liver Int* 44, 228–240. <https://doi.org/10.1111/liv.15770>
- Kamal, H., Westman, G., Falconer, K., Duberg, A.-S., Weiland, O., Haverinen, S., Wejstål, R., Carlsson, T., Kampmann, C., Larsson, S.B., Björkman, P., Nystedt, A., Cardell, K., Svensson, S., Stenmark, S., Wedemeyer, H., Aleman, S., 2020. Long-Term Study of Hepatitis Delta Virus Infection at Secondary Care Centers: The Impact of Viremia on Liver-Related Outcomes. *Hepatology* 72, 1177–1190. <https://doi.org/10.1002/hep.31214>
- Karayiannis, P., Saldanha, J., Monjardino, J., Farci, P., Thomas, H.C., 1991. Prevention and treatment of hepatitis delta virus infection. *Prog Clin Biol Res* 364, 377–383.
- Karimzadeh, H., Kiraithe, M.M., Oberhardt, V., Alizei, E.S., Bockmann, J., Wiesch, J.S. zur, Budeus, B., Hoffmann, D., Wedemeyer, H., Cornberg, M., Krawczyk, A., Rashidi-Alavijeh, J., Rodríguez-Frías, F., Casillas, R., Buti, M., Smedile, A., Alavian, S.M., Heinold, A., Emmerich, F., Panning, M., Gostick, E., Price, D.A., Timm, J., Hofmann, M., Raziorrouh, B., Thimme, R., Protzer, U., Roggendorf, M., Neumann-Haefelin, C., 2019. Mutations in Hepatitis D Virus Allow It to Escape Detection by CD8+ T Cells and Evolve at the Population Level. *Gastroenterology* 156, 1820–1833. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.02.003>
- Kaur, B.P., Secord, E., 2019. Innate Immunity. *Pediatric Clinics of North America, Pediatric Immunology and Allergy* 66, 905–911. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2019.06.011>
- Kim, S.W., Yoon, J.S., Lee, M., Cho, Y., 2022. Toward a complete cure for chronic hepatitis B: Novel therapeutic targets for hepatitis B virus. *Clin Mol Hepatol* 28, 17–30. <https://doi.org/10.3350/cmh.2021.0093>
- Koh, C., Canini, L., Dahari, H., Zhao, X., Uprichard, S.L., Haynes-Williams, V., Winters, M.A., Subramanya, G., Cooper, S.L., Pinto, P., Wolff, E.F., Bishop, R., Han, M.A.T., Cotler, S.J., Kleiner, D.E., Keskin, O., Idilman, R., Yurdaydin, C., Glenn, J.S., Heller, T., 2015. Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. *Lancet Infect Dis* 15, 1167–1174. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00074-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00074-2)
- Koh, C., Heller, T., Glenn, J.S., 2019. Pathogenesis of and New Therapies for Hepatitis D. *Gastroenterology* 156, 461–476.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.09.058>
- Koh, C., Hercun, J., Rahman, F., Huang, A., Da, B., Surana, P., Kapuria, D., Rotman, Y., Vittal, A., Gilman, C.A., Yakov, G.B., Lai, W., Dahari, H., Glenn, J., Heller, T., 2020. LBP13 - A Phase 2 Study of Peginterferon Lambda, Lonafarnib and Ritonavir for 24

- Weeks: End-of-Treatment Results from the LIFT HDV Study. *Journal of Hepatology*, EASL: The Digital International Liver Congress 73, S130. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(20\)30774-1](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(20)30774-1)
- Kos, A., Dijkema, R., Arnberg, A.C., van der Meide, P.H., Schellekens, H., 1986. The hepatitis delta (δ) virus possesses a circular RNA. *Nature* 323, 558–560. <https://doi.org/10.1038/323558a0>
- Kozlowski, A., Harris, J.M., 2001. Improvements in protein PEGylation: pegylated interferons for treatment of hepatitis C. *Journal of Controlled Release, Proceedings of the Sixth European Symposium on Controlled Drug Delivery* 72, 217–224. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00277-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00277-2)
- Kramvis, A., Kostaki, E.-G., Hatzakis, A., Paraskevis, D., 2018. Immunomodulatory Function of HBeAg Related to Short-Sighted Evolution, Transmissibility, and Clinical Manifestation of Hepatitis B Virus. *Front Microbiol* 9, 2521. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02521>
- Kuo, M.Y., Chao, M., Taylor, J., 1989. Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen. *J Virol* 63, 1945–1950. <https://doi.org/10.1128/JVI.63.5.1945-1950.1989>
- Kuo, M.Y., Goldberg, J., Coates, L., Mason, W., Gerin, J., Taylor, J., 1988. Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from an infected woodchuck liver: sequence, structure, and applications. *J Virol* 62, 1855–1861. doi: 10.1128/JVI.62.6.1855-1861.1988.
- Kushner, T., 2023. Delta hepatitis epidemiology and the global burden of disease. *Journal of Viral Hepatitis* 30, 5–11. <https://doi.org/10.1111/jvh.13797>
- Kushner, T., Da, B.L., Chan, A., Dieterich, D., Sigel, K., Saberi, B., 2021. Liver Transplantation for Hepatitis D Virus in the United States: A UNOS Study on Outcomes in the MELD Era. *Transplant Direct* 8, e1253. <https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000001253>
- Lai, M.M.C., 2005. RNA Replication without RNA-Dependent RNA Polymerase: Surprises from Hepatitis Delta Virus. *J Virol* 79, 7951–7958. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.7951-7958.2005>
- Lampertico, P., Roulot, D., Wedemeyer, H., 2022. Bulevirtide with or without pegIFN α for patients with compensated chronic hepatitis delta: From clinical trials to real-world studies. *Journal of Hepatology* 77, 1422–1430. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.06.010>
- Lange, F., Garn, J., Anagho, H.A., Vondran, F.W.R., von Hahn, T., Pietschmann, T., Carpentier, A., 2023. Hepatitis D virus infection, innate immune response and antiviral treatments in stem cell-derived hepatocytes. *Liver International* 43, 2116–2129. <https://doi.org/10.1111/liv.15655>
- Le Gal, F., Brichler, S., Drugan, T., Alloui, C., Roulot, D., Pawlotsky, J.-M., Dény, P., Gordien, E., 2017. Genetic diversity and worldwide distribution of the deltavirus genus: A study of 2,152 clinical strains. *Hepatology* 66, 1826–1841. <https://doi.org/10.1002/hep.29574>
- Le Vee, M., Lecureur, V., Stieger, B., Fardel, O., 2009. Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α or interleukin-6. *Drug Metab Dispos* 37, 685–693. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.023630>
- Lee, C.-H., Chang, S.C., Wu, C.H.H., Chang, M.-F., 2001. A Novel Chromosome Region Maintenance 1-independent Nuclear Export Signal of the Large Form of Hepatitis Delta Antigen That Is Required for the Viral Assembly. *Journal of Biological Chemistry* 276, 8142–8148. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004477200>

- Lee, G.S., Purdy, M.A., Choi, Y., 2023. Cell Culture Systems for Studying Hepatitis B and Hepatitis D Virus Infections. *Life (Basel)* 13, 1527. <https://doi.org/10.3390/life13071527>
- Legrand, A.-F., Lucifora, J., Lacombe, B., Ménard, C., Michelet, M., Foca, A., Abrial, P., Salvetti, A., Rivoire, M., Lotteau, V., Durantel, D., André, P., Ramière, C., 2023. Farnesoid X receptor alpha ligands inhibit HDV in vitro replication and virion infectivity. *Hepatol Commun* 7, e0078. <https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000078>
- Lempp, F.A., Schlund, F., Rieble, L., Nussbaum, L., Link, C., Zhang, Z., Ni, Y., Urban, S., 2019. Recapitulation of HDV infection in a fully permissive hepatoma cell line allows efficient drug evaluation. *Nat Commun* 10, 2265. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10211-2>
- Li, Q., Ding, M., Wang, H., 1995. The infection of hepatitis D virus in adult tupaia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 75, 611–613, 639–640.
- Li, Y.-J., Macnaughton, T., Gao, L., Lai, M.M.C., 2006. RNA-templated replication of hepatitis delta virus: genomic and antigenomic RNAs associate with different nuclear bodies. *J Virol* 80, 6478–6486. <https://doi.org/10.1128/JVI.02650-05>
- Liu, Y., Ruan, H., Li, Y., Sun, G., Liu, X., He, W., Mao, F., He, M., Yan, L., Zhong, G., Yan, H., Li, W., Zhang, Z., 2021. Potent and Specific Inhibition of NTCP-Mediated HBV/HDV Infection and Substrate Transporting by a Novel, Oral-Available Cyclosporine A Analogue. *J Med Chem* 64, 543–565. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01484>
- Lotto, M., Fontaine, H., Marcellin, F., Périères, L., Bureau-Stoltmann, M., Carrat, F., Pol, S., Zoulim, F., Carrieri, P., 2022. Hepatitis Delta virus in migrants: The challenge of elimination (ANRS CO22 HEPATHER cohort). *Liver Int* 42, 249–252. <https://doi.org/10.1111/liv.15106>
- Lucifora, J., Alfaïate, D., Pons, C., Michelet, M., Ramirez, R., Fusil, F., Amirache, F., Rossi, A., Legrand, A.-F., Charles, E., Vegna, S., Farhat, R., Rivoire, M., Passot, G., Gadot, N., Testoni, B., Bach, C., Baumert, T.F., Hyrina, A., Beran, R.K., Zoulim, F., Boonstra, A., Büning, H., Verrier, E.R., Cosset, F.-L., Fletcher, S.P., Salvetti, A., Durantel, D., 2023. Hepatitis D virus interferes with hepatitis B virus RNA production via interferon-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Hepatology* 78, 958–970. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.01.005>
- Lucifora, J., Delphin, M., 2020. Current knowledge on Hepatitis Delta Virus replication. *Antiviral Research* 179, 104812. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104812>
- Lucifora, J., Michelet, M., Rivoire, M., Protzer, U., Durantel, D., Zoulim, F., 2020. Two-dimensional-cultures of primary human hepatocytes allow efficient HBV infection: Old tricks still work! *Journal of Hepatology* 73, 449–451. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.03.042>
- Lucifora, J., Verrier, E.R., Baumert, T.F., 2022. Inhibiting cell-to-cell transmission to reach HDV cure: The importance of IFN- α . *J Hepatol* 77, 903–905. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.07.015>
- Luetgehetmann, M., Giersch, K., Volz, T., Kah, J., Allweiss, L., Lohse, A., Petersen, J., Casey, J., Sureau, C., Dandri, M., 2018. SAT-364 - Murine hepatocytes with humanized sodium taurocholat polypeptide (NTCP) limit HDV infection in vivo independent of adaptive immune responses. *Journal of Hepatology, The International Liver Congress 2018 Abstract Book* 68, S771–S772. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(18\)31809-9](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(18)31809-9)
- Luo, G.X., Chao, M., Hsieh, S.Y., Sureau, C., Nishikura, K., Taylor, J., 1990. A specific base transition occurs on replicating hepatitis delta virus RNA. *J Virol* 64, 1021–1027.

- Lütgehetmann, M., Mancke, L.V., Volz, T., Helbig, M., Allweiss, L., Bornscheuer, T., Pollok, J.M., Lohse, A.W., Petersen, J., Urban, S., Dandri, M., 2012. Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. *Hepatology* 55, 685–694. <https://doi.org/10.1002/hep.24758>
- MacNaughton, T.B., Gowans, E.J., McNamara, S.P., Burrell, C.J., 1991. Hepatitis delta antigen is necessary for access of hepatitis delta virus RNA to the cell transcriptional machinery but is not part of the transcriptional complex. *Virology* 184, 387–390. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90855-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90855-6)
- MacNaughton, T.B., Shi, S.T., Modahl, L.E., Lai, M.M.C., 2002. Rolling Circle Replication of Hepatitis Delta Virus RNA Is Carried Out by Two Different Cellular RNA Polymerases. *J Virol* 76, 3920–3927. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.8.3920-3927.2002>
- Maestro, S., Gómez-Echarte, N., Camps, G., Usai, C., Suárez, L., Vales, Á., Olagüe, C., Aldabe, R., González-Aseguinolaza, G., 2021. AAV-HDV: An Attractive Platform for the In Vivo Study of HDV Biology and the Mechanism of Disease Pathogenesis. *Viruses* 13, 788. <https://doi.org/10.3390/v13050788>
- Makuch, E., Jasyk, I., Kula, A., Lipiński, T., Siednienko, J., 2022. IFN β -Induced CXCL10 Chemokine Expression Is Regulated by Pellino3 Ligase in Monocytes and Macrophages. *Int J Mol Sci* 23, 14915. <https://doi.org/10.3390/ijms232314915>
- Malmström, S., Larsson, S.B., Hannoun, C., Lindh, M., 2012. Hepatitis B Viral DNA Decline at Loss of HBeAg Is Mainly Explained by Reduced cccDNA Load – Down-Regulated Transcription of PgRNA Has Limited Impact. *PLoS One* 7, e36349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036349>
- Marion, M.-J., Hantz, O., Durantel, D., 2010. The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. *Methods Mol Biol* 640, 261–272. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7_13
- Martinez, M.G., Villeret, F., Testoni, B., Zoulim, F., 2020. Can we cure hepatitis B virus with novel direct-acting antivirals? *Liver Int* 40 Suppl 1, 27–34. <https://doi.org/10.1111/liv.14364>
- Martini, S., Tandoi, F., Romagnoli, R., Rizzetto, M., 2022. Liver Transplantation in Hepatitis B/Hepatitis D (Delta) Virus Coinfected Recipients. *Transplantation* 106, 1935. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000004138>
- Mateo, R., Xu, S., Shornikov, A., Yazdi, T., Liu, Y., May, L., Han, B., Han, D., Martin, R., Manhas, S., Richards, C., Marceau, C., Aeschbacher, T., Chang, S., Manuilov, D., Hollnberger, J., Urban, S., Asselah, T., Abdurakhmanov, D., Lampertico, P., Maiorova, E., Mo, H., 2023. Broad-spectrum activity of bulevirtide against clinical isolates of HDV and recombinant pan-genotypic combinations of HBV/HDV. *JHEP Rep* 5, 100893. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2023.100893>
- McNair, A.N., Cheng, D., Monjardino, J., Thomas, H.C., Kerr, I.M., 1994. Hepatitis delta virus replication in vitro is not affected by interferon-alpha or -gamma despite intact cellular responses to interferon and dsRNA. *J Gen Virol* 75, 1371–1378. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-6-1371>
- Medzhitov, R., Janeway, C., 2000. Innate Immunity. *New England Journal of Medicine* 343, 338–344. <https://doi.org/10.1056/NEJM200008033430506>
- Meier, A., Mehrle, S., Weiss, T.S., Mier, W., Urban, S., 2013. Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *Hepatology* 58, 31–42. <https://doi.org/10.1002/hep.26181>
- Mello, F.C.A., Barros, T.M., Angelice, G.P., Costa, V.D., Mello, V.M., Pardini, M.I.M.C., Lampe, E., Lago, B.V., Villar, L.M., 2023. Circulation of HDV Genotypes in Brazil: Identification of a Putative Novel HDV-8 Subgenotype. *Microbiol Spectr* 11, e0396522. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03965-22>

- Melo Da Silva, E., Kay, A., Lobato, C., Muwonge, R., Zoulim, F., Brites, C., Parana, R., Trepo, C., 2019. Non-F HBV/HDV-3 coinfection is associated with severe liver disease in Western Brazilian Amazon. *Journal of Medical Virology* 91, 1081–1086. <https://doi.org/10.1002/jmv.25411>
- Metz, M., Gualdoni, G.A., Winkler, H.-M., Warenits, A.-M., Stöckl, J., Burgmann, H., Winkler, S., Oesterreicher, Z.A., 2023. MxA for differentiating viral and bacterial infections in adults: a prospective, exploratory study. *Infection* 51, 1329–1337. <https://doi.org/10.1007/s15010-023-01986-0>
- Meuleman, P., Libbrecht, L., De Vos, R., de Hemptinne, B., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Roskams, T., Leroux-Roels, G., 2005. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology* 41, 847. <https://doi.org/10.1002/hep.20657>
- Miao, Z., Zhang, S., Ou, X., Li, S., Ma, Z., Wang, W., Peppelenbosch, M.P., Liu, J., Pan, Q., 2020. Estimating the Global Prevalence, Disease Progression, and Clinical Outcome of Hepatitis Delta Virus Infection. *J Infect Dis* 221, 1677–1687. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz633>
- Michelet, M., Alfaiate, D., Chardès, B., Pons, C., Faure-Dupuy, S., Engleitner, T., Farhat, R., Riedl, T., Legrand, A.-F., Rad, R., Rivoire, M., Zoulim, F., Heikenwälder, M., Salvetti, A., Durantel, D., Lucifora, J., 2022. Inducers of the NF-κB pathways impair hepatitis delta virus replication and strongly decrease progeny infectivity in vitro. *JHEP Rep* 4, 100415. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100415>
- Miller, D.J., 1980. Seroepidemiology of viral hepatitis: Correlation with clinical findings. *Postgraduate Medicine* 68, 137–148. <https://doi.org/10.1080/00325481.1980.11715538>
- Nassal, M., 2015. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut* 64, 1972–1984. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309809>
- Negro, F., 2014. Hepatitis D Virus Coinfection and Superinfection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4, a021550. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021550>
- Negro, F., Korba, B.E., Forzani, B., Baroudy, B.M., Brown, T.L., Gerin, J.L., Ponzetto, A., 1989. Hepatitis delta virus (HDV) and woodchuck hepatitis virus (WHV) nucleic acids in tissues of HDV-infected chronic WHV carrier woodchucks. *J Virol* 63, 1612–1618. <https://doi.org/10.1128/JVI.63.4.1612-1618.1989>
- Negro, F., Lok, A.S., 2023. Hepatitis D: A Review. *JAMA* 330, 2376–2387. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.23242>
- Ni, Y., Lempp, F.A., Mehrle, S., Nkongolo, S., Kaufman, C., Fälth, M., Stindt, J., Königer, C., Nassal, M., Kubitz, R., Sülthmann, H., Urban, S., 2014. Hepatitis B and D Viruses Exploit Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide for Species-Specific Entry into Hepatocytes. *Gastroenterology* 146, 1070–1083.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.12.024>
- Ni, Y., Zhang, Z., Engelskircher, L., Verch, G., Tu, T., Lempp, F.A., Urban, S., 2019. Generation and characterization of a stable cell line persistently replicating and secreting the human hepatitis delta virus. *Sci Rep* 9, 10021. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46493-1>
- Nie, Y.-Z., Zheng, Y.-W., Miyakawa, K., Murata, S., Zhang, R.-R., Sekine, K., Ueno, Y., Takebe, T., Wakita, T., Ryo, A., Taniguchi, H., 2018. Recapitulation of hepatitis B virus–host interactions in liver organoids from human induced pluripotent stem cells. *EBioMedicine* 35, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.08.014>
- Niro, G.A., Casey, J.L., Gravinese, E., Garrubba, M., Conoscitore, P., Sagnelli, E., Durazzo, M., Caporaso, N., Perri, F., Leandro, G., Facciorusso, D., Rizzetto, M., Andriulli, A.,

1999. Intrafamilial transmission of hepatitis delta virus: molecular evidence. *Journal of Hepatology* 30, 564–569. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(99\)80185-8](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(99)80185-8)
- Niro, G.A., Ciancio, A., Tillman, H.L., Lagget, M., Olivero, A., Perri, F., Fontana, R., Little, N., Campbell, F., Smedile, A., Manns, M.P., Andriulli, A., Rizzetto, M., 2005. Lamivudine therapy in chronic delta hepatitis: a multicentre randomized-controlled pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 22, 227–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02542.x>
- Niro, G.A., Smedile, A., Ippolito, A.M., Ciancio, A., Fontana, R., Olivero, A., Valvano, M.R., Abate, M.L., Gioffreda, D., Caviglia, G.P., Rizzetto, M., Andriulli, A., 2010. Outcome of chronic delta hepatitis in Italy: A long-term cohort study. *Journal of Hepatology* 53, 834–840. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.06.008>
- Oberhardt, V., Hofmann, M., Thimme, R., Neumann-Haefelin, C., 2022. Adaptive Immune Responses, Immune Escape and Immune-Mediated Pathogenesis during HDV Infection. *Viruses* 14, 198. <https://doi.org/10.3390/v14020198>
- Olivero, A., Smedile, A., 2012. Hepatitis delta virus diagnosis. *Semin Liver Dis* 32, 220–227. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1323627>
- Orning, P., Lien, E., 2021. Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity. *J Leukoc Biol* 109, 121–141. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0420-305R>
- Ortega-Prieto, A.M., Skelton, J.K., Wai, S.N., Large, E., Lussignol, M., Vizcay-Barrena, G., Hughes, D., Fleck, R.A., Thursz, M., Catanese, M.T., Dorner, M., 2018. 3D microfluidic liver cultures as a physiological preclinical tool for hepatitis B virus infection. *Nat Commun* 9, 682. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02969-8>
- Otto, J.C., Casey, P.J., 1996. The hepatitis delta virus large antigen is farnesylated both in vitro and in animal cells. *J Biol Chem* 271, 4569–4572. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.9.4569>
- Palatini, M., Müller, S.F., Kirstgen, M., Leiting, S., Lehmann, F., Soppa, L., Goldmann, N., Müller, C., Lowjaga, K.A.A.T., Alber, J., Ciarimboli, G., Ziebuhr, J., Glebe, D., Geyer, J., 2022. IFITM3 Interacts with the HBV/HDV Receptor NTCP and Modulates Virus Entry and Infection. *Viruses* 14, 727. <https://doi.org/10.3390/v14040727>
- Palom, A., Rando-Segura, A., Vico, J., Pacín, B., Vargas, E., Barreira-Díaz, A., Rodríguez-Frías, F., Riveiro-Barciela, M., Esteban, R., Buti, M., 2022. Implementation of anti-HDV reflex testing among HBsAg-positive individuals increases testing for hepatitis D. *JHEP Rep* 4, 100547. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2022.100547>
- Papatheodoridi, M., Papatheodoridis, G.V., 2021. Is hepatitis delta underestimated? *Liver Int* 41 Suppl 1, 38–44. <https://doi.org/10.1111/liv.14833>
- Patel, E.U., Thio, C.L., Boon, D., Thomas, D.L., Tobian, A.A.R., 2019. Prevalence of Hepatitis B and Hepatitis D Virus Infections in the United States, 2011–2016. *Clinical Infectious Diseases* 69, 709–712. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz001>
- Patmore, L.A., van der Eijk, A.A., Janssen, H.L.A., de Man, R.A., Sonneveld, M.J., 2023. Increase in HDV replication during steroid therapy – potential implications for testing and treatment strategies. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.11.019>
- Perez-Vargas, J., Amirache, F., Boson, B., Mialon, C., Freitas, N., Sureau, C., Fusil, F., Cosset, F.-L., 2019. Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. *Nat Commun* 10, 2098. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10117-z>
- Pestka, S., Krause, C.D., Walter, M.R., 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews* 202, 8–32. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x>

- Pflüger, L.S., Nörz, D., Volz, T., Giersch, K., Giese, A., Goldmann, N., Glebe, D., Bockmann, J.-H., Pfefferle, S., Dandri, M., Schulze zur Wiesch, J., Lütgehetmann, M., 2021a. Clinical establishment of a laboratory developed quantitative HDV PCR assay on the cobas6800 high-throughput system. *JHEP Rep* 3, 100356. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100356>
- Pflüger, L.S., Schulze Zur Wiesch, J., Polywka, S., Lütgehetmann, M., 2021b. Hepatitis delta virus propagation enabled by hepatitis C virus-Scientifically intriguing, but is it relevant to clinical practice? *J Viral Hepat* 28, 213–216. <https://doi.org/10.1111/jvh.13385>
- Polson, A.G., Bass, B.L., Casey, J.L., 1996. RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase. *Nature* 380, 454–456. <https://doi.org/10.1038/380454a0>
- Polson, A.G., Ley, H.L., Bass, B.L., Casey, J.L., 1998. Hepatitis Delta Virus RNA Editing Is Highly Specific for the Amber/W Site and Is Suppressed by Hepatitis Delta Antigen. *Mol Cell Biol* 18, 1919–1926. doi: 10.1128/MCB.18.4.1919.
- Ponzetto, A., Cote, P.J., Popper, H., Hoyer, B.H., London, W.T., Ford, E.C., Bonino, F., Purcell, R.H., Gerin, J.L., 1984. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta agent to the eastern woodchuck. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2208–2212. doi: 10.1073/pnas.81.7.2208.
- Ponzetto, A., Hoyer, B.H., Popper, H., Engle, R., Purcell, R.H., Gerin, J.L., 1987. Titration of the Infectivity of Hepatitis D Virus in Chimpanzees. *The Journal of Infectious Diseases* 155, 72–78. <https://doi.org/10.1093/infdis/155.1.72>
- Pugnale, P., Pazienza, V., Guilloux, K., Negro, F., 2009. Hepatitis delta virus inhibits alpha interferon signaling. *Hepatology* 49, 398–406. <https://doi.org/10.1002/hep.22654>
- Razavi, H.A., Buti, M., Terrault, N.A., Zeuzem, S., Yurdaydin, C., Tanaka, J., Aghemo, A., Akarca, U.S., Al Masri, N.M., Alalwan, A.M., Aleman, S., Alghamdi, A.S., Alghamdi, S., Al-Hamoudi, W.K., Aljumah, A.A., Altraif, I.H., Asselah, T., Ben-Ari, Z., Berg, T., Biondi, M.J., Blach, S., Braga, W.S.M., Brandão-Mello, C.E., Brunetto, M.R., Cabezas, J., Cheinquer, H., Chen, P.-J., Cheon, M.-E., Chuang, W.-L., Coffin, C.S., Coppola, N., Craxi, A., Crespo, J., De Ledinghen, V., Duberg, A.-S., Etzion, O., Ferraz, M.L.G., Ferreira, P.R.A., Forns, X., Foster, G.R., Gaeta, G.B., Gamkrelidze, I., García-Samaniego, J., Gheorghe, L.S., Gholam, P.M., Gish, R.G., Glenn, J., Hercun, J., Hsu, Y.-C., Hu, C.-C., Huang, J.-F., Janjua, N., Jia, J., Kåberg, M., Kaita, K.D.E., Kamal, H., Kao, J.-H., Kondili, L.A., Lagging, M., Lázaro, P., Lazarus, J.V., Lee, M.-H., Lim, Y.-S., Marotta, P.J., Navas, M.-C., Naveira, M.C.M., Orrego, M., Osiewy, C., Pan, C.Q., Pessoa, M.G., Raimondo, G., Ramji, A., Razavi-Shearer, D.M., Razavi-Shearer, K., Ríos-Hincapié, C.Y., Rodríguez, M., Rosenberg, W.M.C., Roulot, D.M., Ryder, S.D., Safadi, R., Sanai, F.M., Santantonio, T.A., Sarrazin, C., Shouval, D., Tacke, F., Tergast, T.L., Villalobos-Salcedo, J.M., Voeller, A.S., Yang, H.-I., Yu, M.-L., Zuckerman, E., Polaris Observatory, 2023. Hepatitis D double reflex testing of all hepatitis B carriers in low-HBV- and high-HBV/HDV-prevalence countries. *J Hepatol* 79, 576–580. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.02.041>
- Rizzetto, M., 1983. The Delta Agent. *Hepatology* 3, 729–737. <https://doi.org/10.1002/hep.1840030518>
- Rizzetto, M., Canese, M.G., Gerin, J.L., London, W.T., Sly, D.L., Purcell, R.H., 1980a. Transmission of the Hepatitis B Virus-Associated Delta Antigen to Chimpanzees. *The Journal of Infectious Diseases* 141, 590–602. <https://doi.org/10.1093/infdis/141.5.590>
- Rizzetto, M., Hamid, S., Negro, F., 2021. The changing context of hepatitis D. *Journal of Hepatology* 74, 1200–1211. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.01.014>

- Rizzetto, M., Hoyer, B., Canese, M.G., Shih, J.W., Purcell, R.H., Gerin, J.L., 1980b. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 6124–6128. doi: 10.1073/pnas.77.10.6124
- Rizzetto, M., Rosina, F., Saracco, G., Bellando, P.C., Actis, G.C., Bonino, F., Smedile, A., Trinchero, P., Sansalvadore, F., Pintus, C., 1986. Treatment of chronic delta hepatitis with alpha-2 recombinant interferon. *J Hepatol* 3 Suppl 2, S229-233. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(86\)80125-8](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(86)80125-8)
- Robert Koch-Institut, 2023. Epidemiologisches Bulletin der Ständigen Impfkommission (STIKO) beim Robert-Koch-Institut 4/2023. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2023/Ausgaben/04_23.pdf?__blob=publicationFile (Stand 16.01.2024, 17:01 Uhr).
- Roder, J.C., 1979. The beige mutation in the mouse. I. A stem cell predetermined impairment in natural killer cell function. *J Immunol* 123, 2168–2173.
- Roll, G.R., Willenbring, H., 2010. Transplanted nonviable human hepatocytes produce appreciable serum albumin levels in mice. *Stem Cell Research* 5, 267–270. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2010.07.004>
- Romeo, R., Del Ninno, E., Rumi, M., Russo, A., Sangiovanni, A., de Franchis, R., Ronchi, G., Colombo, M., 2009. A 28-year study of the course of hepatitis Delta infection: a risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 136, 1629–1638. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.052>
- Romeo, R., Foglieni, B., Casazza, G., Spreafico, M., Colombo, M., Prati, D., 2014. High serum levels of HDV RNA are predictors of cirrhosis and liver cancer in patients with chronic hepatitis delta. *PLoS One* 9, e92062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092062>
- Roulot, D., Brichtler, S., Layese, R., BenAbdesslam, Z., Zoulim, F., Thibault, V., Scholtes, C., Roche, B., Castelnau, C., Poynard, T., Chazouillères, O., Ganne, N., Fontaine, H., Gournay, J., Guyader, D., Gal, F.L., Nahon, P., Roudot-Thoraval, F., Gordien, E., Grangé, J.-D., Landman, R., Hezode, C., Riachi, G., Lascoux-Combe, C., Loustaud-Ratti, V., Rosa, I., Mathurin, P., Nguyen-Khac, E., Causse, X., Naveau, S., Habersetzer, F., Metivier, S., Labadie, H., Sellier, P., Bottero, J., Ledinghen, V. de, Alric, L., Calès, P., Goujard, C., Cadranet, J.-F., Salmon, D., Hillaire, S., 2020. Origin, HDV genotype and persistent viremia determine outcome and treatment response in patients with chronic hepatitis delta. *Journal of Hepatology* 73, 1046–1062. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.06.038>
- Ryu, W.S., Netter, H.J., Bayer, M., Taylor, J., 1993. Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus. *J Virol* 67, 3281–3287. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.6.3281-3287.1993>
- Sagnelli, C., Pisaturo, M., Curatolo, C., Codella, A.V., Coppola, N., Sagnelli, E., 2021. Hepatitis B virus/hepatitis D virus epidemiology: Changes over time and possible future influence of the SARS-CoV-2 pandemic. *World J Gastroenterol* 27, 7271–7284. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i42.7271>
- Salpini, R., Piermatteo, L., Torre, G., D’Anna, S., Khan, S., Duca, L., Bertoli, A., La Frazia, S., Malagnino, V., Teti, E., Iannetta, M., Paba, P., Ciotti, M., Lenci, I., Francioso, S., Paquazzi, C., Lichtner, M., Mastroianni, C., Santopaolo, F., De Sanctis, G., Pellicelli, A., Galati, G., Moretti, A., Casinelli, K., Caterini, L., Iapadre, N., Parruti, G., Vecchiet, I., Paoloni, M., Marignani, M., Ceccherini-Silberstein, F., Baiocchi, L., Grelli, S., Sarmati, L., Svicher, V., 2024. Prevalence of hepatitis D virus infection in Central Italy has remained stable across the last 2 decades with dominance of subgenotypes 1 and characterized by elevated viral replication. *International Journal of Infectious Diseases* 138, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.11.005>

- Sandgren, E.P., Palmiter, R.D., Heckel, J.L., Daugherty, C.C., Brinster, R.L., Degen, J.L., 1991. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 66, 245–256. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90615-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90615-6)
- Sandmann, L., Berg, T., Deterding, K., Fischer, N., Hinrichsen, H., Petersen, J., Tacke, F., Cornberg, M., Collaborators, 2023. Addendum „Antivirale Therapie der chronischen Hepatitis-D-Virusinfektion“ zur S3-Leitlinie „Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion“ der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS): Juli 2023 – AWMF-Registernummer: 021-11. *Z Gastroenterol* 61, 1635–1653. <https://doi.org/10.1055/a-2181-3046>
- Sandmann, L., Cornberg, M., 2021. Experimental Drugs for the Treatment of Hepatitis D. *J Exp Pharmacol* 13, 461–468. <https://doi.org/10.2147/JEP.S235550>
- Sandmann, L., Degasperi, E., Port, K., Aleman, S., Wallin, J.J., Manuilov, D., Da, B.L., Cornberg, M., Lampertico, P., Maasoumy, B., Wedemeyer, H., Deterding, K., 2024. Liver stiffness measurement as a noninvasive method for the diagnosis of liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis D virus infection. *Aliment Pharmacol Ther* 59, 752–761. <https://doi.org/10.1111/apt.17878>
- Sandmann, L., Wedemeyer, H., 2023. Interferon-based treatment of chronic hepatitis D. *Liver Int* 43 Suppl 1, 69–79. <https://doi.org/10.1111/liv.15410>
- Scheller, L., Hilgard, G., Anastasiou, O., Dittmer, U., Kahraman, A., Wedemeyer, H., Deterding, K., 2021. Poor clinical and virological outcome of nucleos(t)ide analogue monotherapy in HBV/HDV co-infected patients. *Medicine (Baltimore)* 100, e26571. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000026571>
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., Rice, C.M., 2014. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu Rev Immunol* 32, 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
- Schoggins, J.W., 2019. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annual Review of Virology* 6, 567–584. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756>
- Schoggins, J.W., 2014. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Curr Opin Virol* 6, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.03.006>
- Seeger, C., Mason, W.S., 2000. Hepatitis B Virus Biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 51–68.
- Sellier, P.O., Maylin, S., Brichler, S., Berçot, B., Lopes, A., Chopin, D., Pogliaghi, M., Munier, A.-L., Delcey, V., Simoneau, G., Evans, J., Gordien, E., Simon, F., Bergmann, J.-F., 2018. Hepatitis B Virus-Hepatitis D Virus mother-to-child co-transmission: A retrospective study in a developed country. *Liver International* 38, 611–618. <https://doi.org/10.1111/liv.13556>
- Sharmeen, L., Kuo, M.Y., Dinter-Gottlieb, G., Taylor, J., 1988. Antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can undergo self-cleavage. *J Virol* 62, 2674–2679. <https://doi.org/10.1128/JVI.62.8.2674-2679.1988>
- Sivasudhan, E., Blake, N., Lu, Z., Meng, J., Rong, R., 2022. Hepatitis B Viral Protein HBx and the Molecular Mechanisms Modulating the Hallmarks of Hepatocellular Carcinoma: A Comprehensive Review. *Cells* 11, 741. <https://doi.org/10.3390/cells11040741>
- Smedile, A., Farci, P., Verme, G., Caredda, F., Cargnel, A., Caporaso, N., Dentico, P., Trepo, C., Opolon, P., Gimson, A., Vergani, D., Williams, R., Rizzetto, M., 1982. Influence of delta infection on severity of hepatitis B. *Lancet* 2, 945–947. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(82\)90156-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(82)90156-8)

- Soriano, V., Moreno-Torres, V., Treviño, A., Corral, O., de Mendoza, C., 2023. Bulevirtide in the Treatment of Hepatitis Delta: Drug Discovery, Clinical Development and Place in Therapy. *Drug Des Devel Ther* 17, 155–166. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S379964>
- Spaan, M., Carey, I., Bruce, M., Shang, D., Horner, M., Dusheiko, G., Agarwal, K., 2020. Hepatitis delta genotype 5 is associated with favourable disease outcome and better response to treatment compared to genotype 1. *Journal of Hepatology* 72, 1097–1104. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.12.028>
- Stephenson-Tsoris, S., Liang, T.J., 2023. Hepatitis Delta Virus–Host Protein Interactions: From Entry to Egress. *Viruses* 15, 1530. <https://doi.org/10.3390/v15071530>
- Stieger, B., 2011. The Role of the Sodium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) and of the Bile Salt Export Pump (BSEP) in Physiology and Pathophysiology of Bile Formation. *Drug Transporters* 205–259. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14541-4_5
- Stockdale, A.J., Kreuels, B., Henrion, M.Y.R., Giorgi, E., Kyomuhangi, I., de Martel, C., Hutin, Y., Geretti, A.M., 2020. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 73, 523–532. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.008>
- Stroffolini, T., Ciancio, A., Furlan, C., Vinci, M., Fontana, R., Russello, M., Colloredo, G., Morisco, F., Coppola, N., Babudieri, S., Ferrigno, L., Sagnelli, C., Sagnelli, E., 2020. Migratory flow and hepatitis delta infection in Italy: A new challenge at the beginning of the third millennium. *Journal of Viral Hepatitis* 27, 941–947. <https://doi.org/10.1111/jvh.13310>
- Suárez-Amarán, L., Usai, C., Di Scala, M., Godoy, C., Ni, Y., Hommel, M., Palomo, L., Segura, V., Olagüe, C., Vales, A., Ruiz-Ripa, A., Buti, M., Salido, E., Prieto, J., Urban, S., Rodríguez-Frias, F., Aldabe, R., González-Aseguinolaza, G., 2017. A new HDV mouse model identifies mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) as a key player in IFN- β induction. *Journal of Hepatology* 67, 669–679. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.010>
- Sumida, K., Igarashi, Y., Toritsuka, N., Matsushita, T., Abe-Tomizawa, K., Aoki, M., Urushidani, T., Yamada, H., Ohno, Y., 2011. Effects of DMSO on gene expression in human and rat hepatocytes. *Hum Exp Toxicol* 30, 1701–1709. <https://doi.org/10.1177/0960327111399325>
- Sureau, C., Jacob, J.R., Eichberg, J.W., Lanford, R.E., 1991. Tissue culture system for infection with human hepatitis delta virus. *J Virol* 65, 3443–3450. doi: 10.1128/JVI.65.7.3443-3450.1991.
- Sureau, C., Negro, F., 2016. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J Hepatol* 64, S102–S116. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.013>
- Tavanez, J.P., Cunha, C., Silva, M.C.A., David, E., Monjardino, J., Carmo-Fonseca, M., 2002. Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *RNA* 8, 637–646. <https://doi.org/10.1017/s1355838202026432>
- Taylor, J., Mason, W., Summers, J., Goldberg, J., Aldrich, C., Coates, L., Gerin, J., Gowans, E., 1987. Replication of human hepatitis delta virus in primary cultures of woodchuck hepatocytes. *J Virol* 61, 2891–2895. <https://doi.org/10.1128/JVI.61.9.2891-2895.1987>
- Terrault, N., Lok, A., McMahon, B., Chang, K., Hwang, J., Jonas, M., Brown, R., Bzowej, N., Wong, J., 2018. Update on Prevention, Diagnosis, and Treatment and of Chronic Hepatitis B: AASLD 2018 Hepatitis B Guidance. *Hepatology* 67, 1560–1599. <https://doi.org/10.1002/hep.29800>
- Tham, C.Y.L., Kah, J., Tan, A.T., Volz, T., Chia, A., Giersch, K., Ladiges, Y., Loglio, A., Borghi, M., Sureau, C., Lampertico, P., Lütgehetmann, M., Dandri, M., Bertoletti, A.,

2020. Hepatitis Delta Virus Acts as an Immunogenic Adjuvant in Hepatitis B Virus-Infected Hepatocytes. *Cell Rep Med* 1, 100060. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100060>
- Tsukuda, S., Watashi, K., 2020. Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Research* 182, 104925. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104925>
- Urban, S., Schulze, A., Dandri, M., Petersen, J., 2010. The replication cycle of hepatitis B virus. *Journal of Hepatology* 52, 282–284. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.10.031>
- Usai, C., Maestro, S., Camps, G., Olague, C., Suárez-Amaran, L., Vales, A., Aragon, T., Hommel, M., Aldabe, R., Gonzalez-Aseguinolaza, G., 2020. TNF-alpha inhibition ameliorates HDV-induced liver damage in a mouse model of acute severe infection. *JHEP Reports* 2, 100098. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100098>
- Vlachogiannakos, J., Papatheodoridis, G.V., 2020. New epidemiology of hepatitis delta. *Liver Int* 40 Suppl 1, 48–53. <https://doi.org/10.1111/liv.14357>
- Wang, K.-S., Choo, Q.-L., Weiner, A.J., Ou, J.-H., Najarian, R.C., Thayer, R.M., Mullenbach, G.T., Denniston, K.J., Gerin, J.L., Houghton, M., 1986. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (δ) viral genome. *Nature* 323, 508–514. <https://doi.org/10.1038/323508a0>
- Wang, Yan, Wei, L., Jiang, D., Cong, X., Fei, R., Xiao, J., Wang, Yu, 2005. In vitro resistance to interferon of hepatitis B virus with precore mutation. *World J Gastroenterol* 11, 649–655. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i5.649>
- Wedemeyer, H., Aleman, S., Brunetto, M.R., Blank, A., Andreone, P., Bogomolov, P., Chulanov, V., Mamonova, N., Geyvandova, N., Morozov, V., Sagalova, O., Stepanova, T., Berger, A., Manuilov, D., Suri, V., An, Q., Da, B., Flaherty, J., Osinusi, A., Liu, Y., Merle, U., Schulze zur Wiesch, J., Zeuzem, S., Ciesek, S., Cornberg, M., Lampertico, P., 2023. A Phase 3, Randomized Trial of Bulevirtide in Chronic Hepatitis D. *New England Journal of Medicine* 389, 22–32. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2213429>
- Wedemeyer, H., Schöneweis, K., Bogomolov, P.O., Chulanov, V., Stepanova, T., Viacheslav, M., Allweiss, L., Dandri, M., Ciesek, S., Dittmer, U., Haefeli, W.-E., Alexandrov, A., Urban, S., 2020. 48 weeks of high dose (10 mg) bulevirtide as monotherapy or with peginterferon alfa-2a in patients with chronic HBV/HDV co-infection. *Journal of Hepatology, EASL: The Digital International Liver Congress* 73, S52–S53. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(20\)30651-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(20)30651-6)
- Wedemeyer, H., Yurdaydin, C., Dalekos, G.N., Erhardt, A., Çakaloğlu, Y., Değertekin, H., Gürel, S., Zeuzem, S., Zachou, K., Bozkaya, H., Koch, A., Bock, T., Dienes, H.P., Manns, M.P., 2011. Peginterferon plus Adefovir versus Either Drug Alone for Hepatitis Delta. *New England Journal of Medicine* 364, 322–331. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0912696>
- Wedemeyer, H., Yurdaydin, C., Hardtke, S., Caruntu, F.A., Curescu, M.G., Yalcin, K., Akarca, U.S., Gürel, S., Zeuzem, S., Erhardt, A., Lüth, S., Papatheodoridis, G.V., Keskin, O., Port, K., Radu, M., Celen, M.K., Idilman, R., Weber, K., Stift, J., Wittkop, U., Heidrich, B., Mederacke, I., von der Leyen, H., Dienes, H.P., Cornberg, M., Koch, A., Manns, M.P., HIDIT-II study team, 2019. Peginterferon alfa-2a plus tenofovir disoproxil fumarate for hepatitis D (HIDIT-II): a randomised, placebo controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis* 19, 275–286. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30663-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30663-7)
- Wei, L., Ploss, A., 2021. Mechanism of Hepatitis B Virus cccDNA Formation. *Viruses* 13, 1463. <https://doi.org/10.3390/v13081463>
- Weiner, A.J., Choo, Q.L., Wang, K.S., Govindarajan, S., Redeker, A.G., Gerin, J.L., Houghton, M., 1988. A single antigenomic open reading frame of the hepatitis delta virus

- encodes the epitope(s) of both hepatitis delta antigen polypeptides p24 delta and p27 delta. *J Virol* 62, 594–599. <https://doi.org/10.1128/JVI.62.2.594-599.1988>
- Weller, M.L., Gardener, M.R., Bogus, Z.C., Smith, M.A., Astorri, E., Michael, D.G., Michael, D.A., Zheng, C., Burbelo, P.D., Lai, Z., Wilson, P.A., Swaim, W., Handelman, B., Afione, S.A., Bombardieri, M., Chiorini, J.A., 2016. Hepatitis Delta Virus Detected in Salivary Glands of Sjögren's Syndrome Patients and Recapitulates a Sjögren's Syndrome-Like Phenotype in Vivo. *Pathog Immun* 1, 12–40. <https://doi.org/10.20411/pai.v1i1.72>
- WHO, 2024. Hepatitis B Fact Sheet. www.WHO.int. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b#:~:text=The%20hepatitis%20B%20virus%20can,from%2030%20to%20180%20days>. (Stand 30.04.2024, 9:57 Uhr).
- WHO, 2023. Hepatitis D Fact Sheet. www.WHO.int. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-d> (Stand 30.04.2024, 10:37 Uhr).
- Winer, B.Y., Gaska, J.M., Lipkowitz, G., Bram, Y., Parekh, A., Parsons, L., Leach, R., Jindal, R., Cho, C.H., Shirao, A., Novik, E., Schwartz, R.E., Ploss, A., 2020. Analysis of Host Responses to Hepatitis B and Delta Viral Infections in a Micro-scalable Hepatic Co-culture System. *Hepatology* 71, 14. <https://doi.org/10.1002/hep.30815>
- Winer, B.Y., Shirvani-Dastgerdi, E., Bram, Y., Sellau, J., Low, B.E., Johnson, H., Huang, T., Hrebikova, G., Heller, B., Sharon, Y., Giersch, K., Gerges, S., Seneca, K., Pais, M.-A., Frankel, A.S., Chiriboga, L., Cullen, J., Nahass, R.G., Lutgehetmann, M., Toettcher, J., Wiles, M.V., Schwartz, R.E., Ploss, A., 2018. Preclinical assessment of antiviral combination therapy in a genetically humanized mouse model for hepatitis delta virus infection. *Sci Transl Med* 10, eaap9328. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aap9328>
- Wong, G.L.H., Gane, E., Lok, A.S.F., 2022. How to achieve functional cure of HBV: Stopping NUCs, adding interferon or new drug development? *J Hepatol* 76, 1249–1262. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.11.024>
- Wranke, A., Heidrich, B., Deterding, K., Hupa-Breier, K.L., Kirschner, J., Bremer, B., Cornberg, M., Wedemeyer, H., 2023. Clinical long-term outcome of hepatitis D compared to hepatitis B mono-infection. *Hepatol Int* 17, 1359–1367. <https://doi.org/10.1007/s12072-023-10575-0>
- Wu, J.-C., 2006. Functional and Clinical Significance of Hepatitis D Virus Genotype II Infection, in: Casey, J.L. (Ed.), *Hepatitis Delta Virus, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 173–186. https://doi.org/10.1007/3-540-29802-9_9
- Xiang, C., Du, Y., Meng, G., Soon Yi, L., Sun, S., Song, N., Zhang, X., Xiao, Y., Wang, J., Yi, Z., Liu, Y., Xie, B., Wu, M., Shu, J., Sun, Da, Jia, J., Liang, Z., Sun, Dong, Huang, Y., Shi, Y., Xu, J., Lu, F., Li, C., Xiang, K., Yuan, Z., Lu, S., Deng, H., 2019. Long-term functional maintenance of primary human hepatocytes in vitro. *Science* 364, 399–402. <https://doi.org/10.1126/science.aau7307>
- Yan, H., Peng, B., He, W., Zhong, G., Qi, Y., Ren, B., Gao, Z., Jing, Z., Song, M., Xu, G., Sui, J., Li, W., 2013. Molecular Determinants of Hepatitis B and D Virus Entry Restriction in Mouse Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide. *J Virol* 87, 7977–7991. <https://doi.org/10.1128/JVI.03540-12>
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., Fu, L., Song, M., Chen, P., Gao, W., Ren, B., Sun, Y., Cai, T., Feng, X., Sui, J., Li, W., 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* 1, e00049. <https://doi.org/10.7554/eLife.00049>

- Yan, Y., Allweiss, L., Yang, D., Kang, J., Wang, J., Qian, X., Zhang, T., Liu, H., Wang, L., Liu, S., Sui, J., Chen, X., Dandri, M., Zhao, J., Lu, F., 2019. Down-regulation of cell membrane localized NTCP expression in proliferating hepatocytes prevents hepatitis B virus infection. *Emerg Microbes Infect* 8, 879–894. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1625728>
- Yang, Y.M., Seki, E., 2015. TNF α in liver fibrosis. *Curr Pathobiol Rep* 3, 253–261. <https://doi.org/10.1007/s40139-015-0093-z>
- Yao, T., Lv, M., Ma, S., Chen, J., Zhang, Y., Yu, Y., Zang, G., Chen, X., 2021. Ubiquitinated Hepatitis D Antigen-Loaded Microvesicles Induce a Potent Specific Cellular Immune Response to Inhibit HDV Replication in Vivo. *Microbiol Spectr* 9, e0102421. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01024-21>
- Ye, X., Tateno, C., Thi, E.P., Kakuni, M., Snead, N.M., Ishida, Y., Barnard, T.R., Sofia, M.J., Shimada, T., Lee, A.C.H., 2019. Hepatitis B Virus Therapeutic Agent ARB-1740 Has Inhibitory Effect on Hepatitis Delta Virus in a New Dually-Infected Humanized Mouse Model. *ACS Infect Dis* 5, 738–749. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00192>
- Yuen, M.-F., Asselah, T., Jacobson, I.M., Brunetto, M.R., Janssen, H.L.A., Takehara, T., Hou, J.L., Kakuda, T.N., Lambrecht, T., Beumont, M., Kalmeijer, R., Guinard-Azadian, C., Mayer, C., Jezowski, J., Verbinnen, T., Lenz, O., Shukla, U., Biermer, M., REEF-1 Study Group, 2023. Efficacy and safety of the siRNA JNJ-73763989 and the capsid assembly modulator JNJ-56136379 (bersacapavir) with nucleos(t)ide analogues for the treatment of chronic hepatitis B virus infection (REEF-1): a multicentre, double-blind, active-controlled, randomised, phase 2b trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 8, 790–802. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(23\)00148-6](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(23)00148-6)
- Yurdaydin, C., Bozkaya, H., Gürel, S., Tillmann, H.L., Aslan, N., Okçu-Heper, A., Erden, E., Yalçın, K., Ilıman, N., Uzunalımoğlu, Ö., Manns, M.P., Bozdayi, A.M., 2002. Famciclovir treatment of chronic delta hepatitis. *Journal of Hepatology* 37, 266–271. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(02\)00162-9](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(02)00162-9)
- Yurdaydin, C., Bozkaya, H., Onder, F.O., Sentürk, H., Karaaslan, H., Akdoğan, M., Cetinkaya, H., Erden, E., Erkan-Esin, O., Yalçın, K., Bozdayi, A.M., Schinazi, R.F., Gerin, J.L., Uzunalımoğlu, O., Ozden, A., 2008. Treatment of chronic delta hepatitis with lamivudine vs lamivudine + interferon vs interferon. *J Viral Hepat* 15, 314–321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2007.00936.x>
- Yurdaydin, C., Keskin, O., Kalkan, Ç., Karakaya, F., Çalışkan, A., Karataylı, E., Karataylı, S., Bozdayi, A.M., Koh, C., Heller, T., Idilman, R., Glenn, J.S., 2018. Optimizing lonafarnib treatment for the management of chronic delta hepatitis: The LOWR HDV-1 study. *Hepatology* 67, 1224–1236. <https://doi.org/10.1002/hep.29658>
- Yurdaydin, C., Keskin, O., Yurdcu, E., Çalışkan, A., Önem, S., Karakaya, F., Kalkan, Ç., Karataylı, E., Karataylı, S., Choong, I., Apelian, D., Koh, C., Heller, T., Idilman, R., Bozdayi, A.M., Glenn, J.S., 2022. A phase 2 dose-finding study of lonafarnib and ritonavir with or without interferon alpha for chronic delta hepatitis. *Hepatology* 75, 1551. <https://doi.org/10.1002/hep.32259>
- Zhang, Z., Filzmayer, C., Ni, Y., Sülthmann, H., Mutz, P., Hiet, M.-S., Vondran, F.W.R., Bartenschlager, R., Urban, S., 2018. Hepatitis D virus replication is sensed by MDA5 and induces IFN- β / λ responses in hepatocytes. *J Hepatol* 69, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.02.021>
- Zhang, Z., Ni, Y., Lempp, F.A., Walter, L., Mutz, P., Bartenschlager, R., Urban, S., 2022. Hepatitis D virus-induced interferon response and administered interferons control cell division-mediated virus spread. *J Hepatol* 77, 957–966. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.05.023>

- Zhang, Z., Urban, S., 2021. New insights into HDV persistence: The role of interferon response and implications for upcoming novel therapies. *J Hepatol* 74, 686–699. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.032>
- Zhao, X., Iqbal, W., Sun, P., Zhou, X., 2021. Na⁺-Taurocholate Co-Transporting Polypeptide (NTCP) in Livers, Function, Expression Regulation, and Potential in Hepatitis B Treatment. *Livers* 1, 236–249. <https://doi.org/10.3390/livers1040019>

8. Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ALT	Alanin-Aminotransferase
cccDNA	covalently closed circular DNA
cDNA	komplementäre DNA
CXCL10	C-X-C motif Chemokin 10
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DMSO	Dimethylsulfoxid
EASL	European Association of the Liver
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
HBcAg	Hepatitis B core Antigen
HBeAg	Hepatitis B e Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBx	Hepatitis B X Protein
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDAg	Hepatitis D Antigen
HDV	Hepatitis-D-Virus
HDV-1cc	Zellkultur-generierter HDV-Virusstamm vom Genotyp 1
HDV-1p	Patientengenerierter HDV-Virusstamm vom Genotyp 1
HEV	Hepatitis-E-Virus
HLA	humanes Leukozytenantigen
IFITM3	Interferon-induziertes Transmembran-Protein 3
IFN α	Interferon alpha
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IRF	Interferon-Regulationsfaktor
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
ISG15	Interferon-stimuliertes Gen 15
JAK	Januskinase
JAK1	Januskinase 1
LGP2	laboratory of physiology and genetics 2
MAVS	mitochondriales antivirales Signalprotein
MDA5	Melanom-Differenzierungsantigen 5
mRNA	Messenger-RNA
MSM	Männer, die Sex mit Männern haben

<i>NF-κB</i>	<i>nukleärer Faktor kappa B</i>
<i>NTCP</i>	<i>Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide</i>
<i>NUCs</i>	<i>Nukleosid- oder Nukleotidanaloga</i>
<i>PAMPs</i>	<i>Pathogen-assoziierte molekulare Muster</i>
<i>PBS</i>	<i>phosphathaltige Pufferlösung, phosphathaltige Pufferlösung</i>
<i>peg-IFNα</i>	<i>pegyliertes Interferon alpha</i>
<i>peg-IFNλ</i>	<i>pegyliertes Interferon lambda</i>
<i>pgRNA</i>	<i>prä-genomische RNA</i>
<i>PHH</i>	<i>primäre humane Hepatozyten</i>
<i>PRR</i>	<i>Pattern-Recognition-Rezeptor</i>
<i>qPCR</i>	<i>quantitative Polymerase-Kettenreaktion</i>
<i>rcDNA</i>	<i>relaxed circular DNA</i>
<i>RIG-I</i>	<i>retinoic acid-inducible gene I</i>
<i>RLR</i>	<i>RIG-I-ähnlicher Rezeptor</i>
<i>SCID</i>	<i>schwerer kombinierter Immundefekt</i>
<i>STAT</i>	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
<i>STIKO</i>	<i>Ständige Impfkommision</i>
<i>TGFβ</i>	<i>transformierender Wachstumsfaktor beta</i>
<i>TLR</i>	<i>Toll-Like-Rezeptor</i>
<i>TNFα</i>	<i>Tumornekrosefaktor alpha</i>
<i>TSA</i>	<i>Tyramid-Signal-Amplifikation</i>
<i>uPA</i>	<i>Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator</i>
<i>UPR</i>	<i>unfolded protein response</i>
<i>USG</i>	<i>uPA/SCID/beige/IL2RG/-</i>
<i>WHO</i>	<i>World Health Organization</i>

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung des Large Delta Antigen (L-HDAg).....	10
Abbildung 2: Schematische Darstellung von HDV und HBV	11
Abbildung 3: HDV-Lebenszyklus	13
Abbildung 4: Prävalenz von anti-HDV Antikörpern in den letzten 10 Jahren	16
Abbildung 5: HBV-Lebenszyklus	18
Abbildung 6: Natürlicher Verlauf einer HDV-Infektion	20
Abbildung 7: Therapeutische Ansätze zur Behandlung der chronischen Hepatitis D und entsprechender Wirkort im HDV-Lebenszyklus.....	28
Abbildung 8: Antwort des angeborenen Immunsystems auf eine HDV-Infektion	31
Abbildung 9: uPA-SCID-Mausmodell für die HBV- und HDV-Infektion	38
Abbildung 10: Versuchsaufbau mit HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs	56
Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung der Leber bei HBV/HDV-1p-Koinfektion.....	57
Abbildung 12: HBV-Parameter nach IFN α -Gabe in HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs.....	61
Abbildung 13: ISG-Expression nach IFN α -Gabe in HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs	63
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von HDAg und HLA nach IFN α -Behandlung in HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs	64
Abbildung 15: Zellzahlparameter und NTCP-Expression in HBV/HDV-1p-koinfizierten PHHs nach IFN α -Behandlung	66
Abbildung 16: Versuchsaufbau mit HBV-infizierten PHHs und HDV-1p-Superinfektion in vitro.....	67
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung der Leber einer HBV-infizierten Maus.....	68
Abbildung 18: Zellzahl-Parameter in HDV-1p-superinfizierten PHHs nach IFN α -Gabe	69
Abbildung 19: HDV-RNA nach IFN α -Behandlung in HDV-1p-superinfizierten PHHs.....	70
Abbildung 20: Intrazelluläre HBV-Parameter in HDV-1p-superinfizierten PHHs nach IFN α - Gabe.....	72
Abbildung 21: Extrazelluläre HBV-Parameter in HDV-1p-superinfizierten PHHs nach IFN α - Gabe.....	74
Abbildung 22: ISG-Expression nach IFN α -Gabe in HDV-1p-superinfizierten PHHs	75
Abbildung 23: NTCP-Expression in HDV-1p-superinfizierten PHHs	76
Abbildung 24: Versuchsaufbau einer HDV-Monoinfektion in kryokonservierten PHHs	77
Abbildung 25: HDV-RNA in HDV-monoinfizierten PHHs nach IFN α -Gabe	78
Abbildung 26: ISG-Expression in HDV-monoinfizierten PHHs nach IFN α -Gabe	79
Abbildung 27: Lichtmikroskopie von HDV-monoinfizierten PHHs	80
Abbildung 28: Zellzahl-Parameter in HDV-monoinfizierten PHHs nach IFN α -Gabe	81
Abbildung 29: NTCP-Expression in HDV-monoinfizierten PHHs nach IFN α -Gabe.....	82

10. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle</i>	<i>Seite</i>
Tabelle 1: Geräte	42
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial	43
Tabelle 3: Biomaterial	43
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien	44
Tabelle 5: Pufferlösungen	45
Tabelle 6: Kits	45
Tabelle 7: Antikörper	46
Tabelle 8: Primer und Sonden	46
Tabelle 9: Taqman-Genexpressionsassays	47

11. Vorveröffentlichungen

Paper: Strain-specific responsiveness of hepatitis D virus to interferon-alpha treatment. Giersch K, Perez-Gonzalez P, Hendricks L, Goldmann N, Kolbe J, Hermanussen L, Bockmann JH, Volz T, Volmari A, Altweiß L, Petersen J, Glebe D, Lütgehetmann M, Dandri M. JHEP Reports. 2023 Jan 24.

Poster: A new patient-derived Hepatitis D virus genotype 1 sensitive to interferon alpha treatment in PHHs isolated from humanized mice. Perez-Gonzalez P, Giersch K, Hendricks L, Goldmann N, Hermanussen L, Bockmann JH, Volz T, Volmari A, Allweiss L, Petersen J, Glebe D, Lütgehetmann M, Dandri M. International HBV-Meeting Toronto, Kanada, 09/2021.

12. Erklärung des Eigenanteils

Die gesamte Zellkulturarbeit nach erfolgter Isolation der Hepatozyten aus der murinen Leber beziehungsweise nach dem Auftauen der kryokonservierten PHHs wurde von mir übernommen. Ausnahmen stellten hierbei der gelegentliche Mediumwechsel dar sowie das Ausplattieren der HBV-infizierten Hepatozyten und die anschließende HDV-1p-Superinfektion der Zellen in vitro. Die Aufzucht und Infektion der Mäuse im USG-Mausmodell sowie die anschließende PHH-Isolation wurde durch andere Mitarbeitende der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Die intra- und extrazelluläre Datenanalyse des Materials aus der Zellkultur erfolgte selbstständig durch mich. Hierzu zählen die Aufreinigung des Zellgewebes zu den verschiedenen Zeitpunkten mit Extraktion der vorhandenen DNA und RNA sowie Umschreibung der RNA in cDNA, die Anfertigung der Immunfluoreszenzfärbungen und anschließende Mikroskopie der Kammerobjektträger und des verbliebenen Lebergewebes sowie die PCR-Messungen aller in dieser Arbeit erhobenen Parameter inkl. humaner und muriner Zellmarker, viraler Parameter und der Bestimmung der Genexpression. Die Bestimmung des HBeAg, HBsAg und der ergänzenden HDV RNA mit dem cobas® 6800 Systems wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Sämtliche der in dieser Arbeit aufgeführten graphischen Darstellungen mit Ausnahme des Maussymbols wurden durch mich erstellt. Die anschließende schriftliche Anfertigung dieser Dissertationsschrift wurde ebenfalls vollständig und selbstständig durch mich verfasst.

13. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum: 17.11.2024

Unterschrift:

14. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Beteiligten, die mir bei der Erstellung meiner Dissertation geholfen haben, meinen Dank aussprechen.

Dem SFB 841 und dem Graduiertenkolleg danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Promotionsstipendiums zur Erstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Maura Dandri für die Ausschreibung des Projektes sowie die zugewandte Betreuung meines Projektes während der letzten Jahre. Trotz erschwerter Umstände im Rahmen der Corona-Pandemie hat sie meinem Projekt die Wege geebnet. Ihre Faszination und Begeisterung für die Forschung sowie ihr steter Optimismus motivierten mich immer wieder neu und trugen maßgeblich zum Gelingen der Doktorarbeit bei.

Dr. Katja Giersch danke ich für die Vorarbeiten an dem Projekt und die engagierte Betreuung meiner Arbeit. Ihrem großen Fachwissen verdanke ich viele wichtige Impulse. Insbesondere zu Beginn des Projektes hat mir ihr geduldiges Eingehen auf die zahllosen Fragen eines Labor-Neulings viel von der anfänglichen Unsicherheit nehmen können.

Bei Dr. Lena Allweiss möchte ich mich für ihre große fachliche Expertise und die kompetente Betreuung insbesondere bei der Verschriftlichung meines Projektes bedanken. Ihr verdanke ich außerdem die Isolation der Hepatozyten, ohne die meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für die Anleitung des Arbeitens in der Zellkultur und die ständige Hilfsbereitschaft im Labor danke ich Martina Fahl. Durch sie habe ich viel Freude an der Laborarbeit entwickelt. Auch Corinna Eggers verdanke ich technische Unterstützung an wichtigen Stellen meines Projektes.

Viele weitere Projektbeteiligte haben mich mit ihrer Expertise unterstützt: Dr. Tassilo Volz hat unermüdlich alle Fragen zu naturwissenschaftlichen Themen beantwortet und mir bei der Lösung jeglicher technischen Schwierigkeit geholfen. Dr. Annika Volmari verdanke die Einweisung in das Mikroskopieren und gleichfalls ein jederzeit offenes Ohr. Moritz Calaminus danke ich für die anfängliche Biochemie-Nachhilfe. Das positive Arbeitsklima im Labor wurde durch sie alle maßgeblich geprägt.

Für viele rege Diskussionen mit spannenden Impulsen sowie Unterstützung bei virologischen Fragestellungen danke ich Dr. Marc Lütgehetmann. Dr. Jan Bockmann verdanke ich die Entwicklung des Zellkulturmodells, ohne das meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Prof. Dr. Dieter Glebe der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich freundlicherweise für die Bereitstellung des HDV1p-Inokulums.

Ein besonderes Erlebnis war die Reise zum HBV-Meeting in Toronto, an der ich in Begleitung von Prof. Dr. Maura Dandri, Dr. Marc Lütgehetmann, Dr. Lena Allweiss und Moritz Calaminus teilnehmen durfte. Es war eine großartige Erfahrung mit vielen lehrreichen wie lustigen Momenten, an die ich mich noch lange Zeit erinnern werde.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für ihre Unterstützung bedanken. Meinen Großeltern danke ich für die jederzeit ermunternden, motivierenden und liebevollen Worte, ihre Anteilnahme und ihre Lebensweisheiten. Meine tiefste Dankbarkeit gilt meinen Eltern, die mich während meines Studiums und auch darüber hinaus stets mit ganzem Herzen und vollster Tatkraft unterstützten und sich selbst vor dem Korrekturlesen dieser Arbeit keine Sekunde scheuten. Ihnen widme ich mit Stolz diese Arbeit.